

**Die extrazelluläre Endonuklease**  
**aus *Serratia marcescens*:**  
**Untersuchungen zur Substratbindung und zur Katalyse**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

– Dr. rer. nat. –

des Fachbereichs Biologie, Chemie und Geowissenschaften, FB 08

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Bettina Haberland

geboren am 16. Februar 1969 in Lingen (Ems)

Gießen, 2001

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie des Fachbereiches Biologie, Chemie und Geowissenschaften (FB 08) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit vom 01.10.1995 bis zum 31.10.2000 (Erziehungsurlaub vom 01.01.1997 bis zum 28.02.1998) unter Anleitung von Prof. Dr. Alfred M. Pingoud angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek  
Institut für Physikalische Chemie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58  
D-35392 Gießen

Referent: Prof. Dr. Alfred M. Pingoud  
Institut für Biochemie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Heinrich-Buff-Ring 58  
D-35392 Gießen

Korreferent: Prof. Dr. Gottfried Wagner  
Institut für Pflanzenphysiologie, FB 08  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Senckenbergstraße 3  
D-35390 Gießen

## Vielen Dank

möchte ich all denen sagen, die mich während der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, unterstützt und bestärkt haben:

Herrn Prof. Dr. Pingoud möchte ich ganz herzlich danken für die Betreuung und seine stets große Anteilnahme am „*Serratia*-Projekt“, die mir immer wieder Motivation und Ansporn waren, besonders aber auch für die Unterstützung und die Gewährung einiger Freiräume, die es erst ermöglicht haben, diese Arbeit trotz „Handicap“ (entschuldige, Jörn) zu beenden.

Herrn Prof. Dr. Wagner danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dr. Peter Friedhoff und Dr. Gregor Meiss möchte ich danken für viele Tips und ihre Hilfe sowie für die Beantwortung so mancher (dummen) Frage.

Vielen lieben Kollegen, besonders Frau Ute Steindorf, Dr. Oleg Gimadutdinow, Dr. Annette Freist, Dr. Claudia Matzen und Herrn Dipl.-Biol. Sebastian Scholz danke ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei vielen „Könntest Du bitte für mich ....?“ .

Allen ehemaligen Mitgliedern des mittäglichen „Feministischen Forums“ danke ich für so manche vergnügliche Pause und den Austausch institutsinterner Neuigkeiten.

Bei den Mitarbeitern des Institutes für Biochemie, insbesondere bei den Nuklease-Leuten, möchte ich mich herzlich für das sehr angenehme Arbeitsklima bedanken, welches das morgendliche Aufstehen etwas erleichtert hat.

Unserer Tagesmutter, der lieben Frau Birgit Karl, danke ich für einige „Extraschichten“. Wir, und insbesondere Jörn, werden sie und ihre fröhliche Art lange in Erinnerung behalten.

Meiner lieben Freundin Annette Freist danke ich für die gemeinsame Zeit in Gießen, für viele lange Telefongespräche, Klön-Nachmittage, Spielabende und besonders für das Babysitten, welches uns so manchen freien Abend ermöglichte.

Meinen Eltern kann ich gar nicht genug danken für Vieles, Vieles, Vieles. Insbesondere möchte ich mich jedoch für die Beherbergung in unserer heimatlosen Zeit bedanken.

Schließlich bedanke ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben, bei Ralf, der mich hält und sehr unterstützt, und bei unseren Jungs Jörn und Marc, die uns eine unerschöpfliche Quelle an Arbeit, aber noch vielmehr an Freude und Glück sind.

## VERZEICHNIS WISSENSCHAFTLICHER PUBLIKATIONEN

Fiedhoff, P., Meiss, G., Kolmes, B., Pieper, U., Gimadutdinow, O., Urbanke, C. & Pingoud, A. (1996). Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the *Serratia* nuclease. *Eur. J. Biochem.* **241**, 572-580.

Kolmes, B., Franke, I., Fiedhoff, P. & Pingoud, A. (1996). Analysis of the reaction mechanism of the non-specific endonuclease of *Serratia marcescens* using an artificial minimal substrate. *FEBS Letters* **397**, 343-346.

Fiedhoff, P., Kolmes, B., Gimadutdinow, O., Wende, W., Krause, K.L. & Pingoud, A. (1996). Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2632-2639.

Meiss, G., Gimadutdinow, O., Haberland, B. & Pingoud, A. (2000). Mechanism of DNA cleavage by the DNA/RNA-non-specific *Anabaena sp.* PCC 7120 endonuclease NucA and its inhibition by NuiA. *J. Mol. Biol.* **297**, 521-534.

## POSTERBEITRÄGE

Meiss, G., Kolmes, B. & Pingoud, A. (1995). Enzymologie der extrazellulären Endonuklease aus *Serratia marcescens*. 4. Werkstattberichte aus der Experimentellen Biologie und Experimentellen Medizin. Justus-Liebig-Universität Gießen, 10.-11. Februar 1995.

Haberland, B., Meiss, G. & Pingoud, A. (1999). Binding of nucleic acids by the *Serratia* endonuclease. 37<sup>th</sup> IUPAC Congress with 27<sup>th</sup> GDCh General Meeting. Berlin, 14.-19. August 1999.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aufgeführt sind die im Text verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme von Formeln für Atome oder Moleküle sowie Abkürzungen von Aminosäuren, die dem Drei- bzw. Einbuchstabencode entsprechen. Besondere Abkürzungen sind direkt im Text erläutert.

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
ε <sup>x</sup>	molarer Extinktionskoeffizient bei x nm
Å	Ångström
λ	Wellenlänge; Bakteriophage Lambda
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
CD	Circulardichroismus
Ci	Curie
cm	Centimeter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E <sup>y</sup>	Extinktion bei y nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	(Ethylendinitrilo)tetraacetat
<i>et al.</i>	und andere ( <i>et altera</i> )
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung; Gramm
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-propansulfonsäure
k <sub>cat</sub>	katalytischer Koeffizient (Umsatzzahl)
kD	kilo-Dalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Konstante
Kap.	Kapitel
K.U.	Kunitz-Unit
l	Liter
LB	Luria-Bertani
<i>lin</i>	linearisiert

m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar
MES	2-N-(Morpholino)ethansulfonsäure
MG	Molekulargewicht
min	Minute
n	nano ( $10^{-9}$ )
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
o.ä.	oder ähnliches
oc	offen zirkulär ( <i>open circle</i> )
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	<i>protein data base</i>
PEG	Polyethylenglycol
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
sc	überspiralisiert ( <i>supercoiled</i> )
SDS	(Natriumdodekylsulfat) <i>Sodium dodecylsulfat</i>
sec	Sekunde
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
STE	Sacharose-Tris-EDTA
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TPE	Tris-Phosphat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>Transformation-Storage-Solution</i>
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
vol.	Volumen
V	Volt
vs.	<i>versus</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>III</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Nukleasen</b>	<b>1</b>
1.1.1 Biologische Funktion von Nukleasen	2
<b>1.2 Die extrazelluläre Endonuklease aus <i>Serratia marcescens</i></b>	<b>4</b>
1.2.1 Eigenschaften und Struktur	4
1.2.2 Das aktive Zentrum der <i>Serratia</i> Nuklease	6
1.2.3 Die <i>Serratia</i> Nuklease-Familie der DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen	8
<b>1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit</b>	<b>11</b>
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Materialien</b>	<b>13</b>
2.1.1 Reagenzien und Biochemikalien	13
2.1.2 Enzyme und Biomoleküle	13
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden</b>	<b>14</b>
2.2.1 Nährmedien zur Bakterienkultur	14
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	15
2.2.3 Der Plasmid-Vektor pHisNuc	15
2.2.4 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	16
2.2.4.1 Bereitung TSS-kompetenter Zellen	16
2.2.4.2 Transformation TSS-kompetenter Zellen	16
2.2.4.3 Bereitung elektrokompeter Zellen	17
2.2.4.4 Elektrotransformation	17

<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>18</b>
2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA	18
2.3.2	Gelelektrophoretische Verfahren	20
2.3.2.1	Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.3.2.2	Analytische Agarosegelelektrophorese	20
2.3.2.3	Präparative Agarosegelelektrophorese	20
2.3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
2.3.3	DNA-Modifikationen	21
2.3.3.1	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen	21
2.3.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.3.3.3	Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden	21
<b>2.4</b>	<b><i>In vitro</i>-Herstellung von Varianten der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>22</b>
2.4.1	Ortsspezifische Mutagenese nach der 2-PCR-Methode	22
2.4.2	<i>Screening</i> nach positiven Transformanden	24
2.4.3	Sequenzierung	25
2.4.4	Aufreinigung rekombinanter Varianten der <i>Serratia</i> Nuklease	26
2.4.4.1	Expression von Nuklease-Varianten in <i>E. coli</i> -Zellen	26
2.4.4.2	Solubilisierung der Nuklease aus <i>inclusion bodies</i>	26
2.4.4.3	Aufreinigung der <i>Serratia</i> Nuklease über Affinitäts-Chromatographie	27
<b>2.5</b>	<b>Spektroskopische Verfahren</b>	<b>27</b>
2.5.1	UV-Spektroskopie zur Konzentrationsbestimmung	27
2.5.2	CD-Spektroskopie	28
<b>2.6</b>	<b>Enzymologie</b>	<b>28</b>
2.6.1	Mikrotiterplatten-Aktivitätsassay	29
2.6.1.1	Erstellen eines pH-Profiles	29
2.6.2	Hyperchromizitäts-Assay (Kunitz-Assay)	30
2.6.2.1	Bestimmung der kinetischen Parameter $k_{\text{cat}}$ und $K_M$	31
2.6.2.2	Untersuchung der Salzabhängigkeit	32
2.6.2.3	Untersuchung der Metallionenabhängigkeit	32
2.6.3	Spaltung kurzer Oligonukleotidsubstrate und Analyse mittels Homochromatographie	33
2.6.4	Spaltung von überspiralisierter Plasmid-DNA	34
2.6.5	Spaltung abasischer Oligonukleotide	35
<b>2.7</b>	<b>Spaltung des artifiziellen Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(<i>p</i>-nitrophenyl)-phosphat</b>	<b>35</b>
2.7.1	Spaltung durch die Wildtyp-Nuklease	36
2.7.2	Kinetische Untersuchungen an Desoxythymidin-di-3'-5'-( <i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat	36
<b>2.8</b>	<b>Proteinstrukturdaten und 3-D-Modellierung</b>	<b>37</b>



<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Produktion rekombinanter Varianten der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>38</b>
3.1.1	Aufreinigung der Nuklease-Varianten	39
3.1.2	CD-Spektroskopie zur Charakterisierung neu generierter Enzymvarianten	40
<b>3.2</b>	<b>Kinetische Untersuchungen an Mutanten der Aminosäure Asparagin 119</b>	<b>42</b>
3.2.1	pH-Profil der Mutante N119D	42
3.2.2	Metallionenabhängigkeit von Enzymvarianten mit Mutationen an der Position 119	43
<b>3.3</b>	<b>Spaltung des Minimalsubstrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(<i>p</i>-nitrophenyl)-phosphat</b>	<b>46</b>
3.3.1	Bestimmung der Spaltposition der <i>Serratia</i> Nuklease im Substrat Desoxythymidin-di-3'-5'-( <i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat	46
3.3.2	Kinetische Untersuchungen an Desoxythymidin-di-3'-5'-( <i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat	49
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der Substratbindungsstelle der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>51</b>
3.4.1	Charakterisierung der nukleolytischen Aktivität der Bindungsmutanten	51
3.4.1.1	Bestimmung der kinetischen Parameter $k_{\text{cat}}$ und $K_{\text{M}}$	52
3.4.1.2	Spaltung kurzer Oligonukleotide zur Kartierung der Bindungsstelle der <i>Serratia</i> Nuklease	54
3.4.2	Plasmidspaltkinetiken zur Analyse des Bindungsverhaltens der Nuklease-Varianten	57
3.4.3	Salzabhängigkeit verschiedener Nuklease-Varianten	60
<b>3.5</b>	<b>Charakterisierung der Nuklease-Varianten Y76A und W123A</b>	<b>62</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Produktion rekombinanter Formen der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>67</b>
<b>4.2</b>	<b>Beiträge zur Aufklärung des Katalysemechanismus der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>67</b>
4.2.1	Die Rolle des Asparagin 119	67
4.2.2	Desoxythymidin-di-3'-5'-( <i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat - Ein neues Minimalsubstrat der <i>Serratia</i> Nuklease	71
4.2.2.1	Die Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-( <i>p</i> -nitrophenyl)-phosphat gibt Hinweise auf den Katalysemechanismus der <i>Serratia</i> Nuklease	74
<b>4.3</b>	<b>Die Substratbindungsstelle der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>76</b>
4.3.1	An der Substratbindung beteiligte Aminosäuren der <i>Serratia</i> Nuklease	77
4.3.1.1	$K_{\text{M}}$ -Mutanten	80
4.3.1.2	Makroskopischer Spaltmechanismus der Bindungsmutanten	80
4.3.1.3	Ionische Wechselwirkungen als Grundlage der Substratbindung	82
4.3.1.4	Die Bedeutung der aromatischen Aminosäuren Tyr76 und Trp123 für die Substratbindung	83

4.3.2	Definition einzelner Bindungsstellen in der Bindungsregion der <i>Serratia</i> Nuklease	84
4.3.2.1	RNase A als Beispiel eines Enzyms mit multiplen Substratbindungsstellen	84
4.3.2.2	Substratbindungsstellen der <i>Serratia</i> Nuklease	86
5	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>94</b>
6	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>96</b>
7	<b>ANHANG</b>	<b>112</b>
7.1	<b>Protein- und Gensequenz der <i>Serratia</i> Nuklease</b>	<b>112</b>
7.2	<b>Sequenzen der verwendeten PCR-Primer</b>	<b>113</b>
7.2.1	PCR-Primer	113
7.2.2	Mutagenese-Primer	113
7.3	<b>Michaelis-Menten-Diagramme der Bindungsmutanten</b>	<b>114</b>
7.4	<b>Plasmidspaltungen</b>	<b>115</b>
7.4.1	Agarosegele	115
7.4.2	Agarosegele und quantitative Auswertungen ausgewählter Mutanten	116
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>118</b>
	<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>119</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Nukleasen

Nukleasen als diejenigen Enzyme, die die Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen in Nukleinsäuren katalysieren, kommen ubiquitär in allen Organismen vor. Das stets steigende wissenschaftliche Interesse an der Erforschung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Proteine gründet sich u.a. darauf, daß ihre Substrate die Träger der genetischen Information und damit molekulare Grundlage jeglichen Lebens sind. Hinzu kommt die überragende Bedeutung beispielsweise der Restriktionsendonukleasen als molekulare Werkzeuge in der Gen- und Biotechnologie sowie die Verwendung einiger Nukleasen in der Medizin. Erwähnt sei hier der Einsatz von humaner DNase I zur Behandlung von Cystischer Fibrose (Ramsey, 1996) sowie die Nutzung der cytotoxischen Aktivität einiger RNase A-Homologe wie der Onconase zur Bekämpfung von Tumoren (Vescia & Tramontano, 1981).

Die einfachsten Nukleasen sind die sog. chemischen Nukleasen (Pei & Schultz, 1993), bei denen ein freies bzw. chelatisiertes Metallion wie z.B.  $\text{Pb}^{2+}$  (Brown *et al.*, 1985) oder  $\text{Fe(II)}\cdot\text{EDTA}$  (Hertzberg & Dervan, 1982) den eigentlichen Katalysator darstellt. Desweiteren können auch RNA-Moleküle, sog. Ribozyme, als Ribonukleasen wirksam werden (Kruger *et al.*, 1982; Been, 1993).

Nukleasen auf Proteinbasis werden auf Grund verschiedener, sich z.T. überschneidender Kriterien eingeteilt: Man unterscheidet nach Art des bevorzugten Substrates DNasen von RNasen, oder nach der Lage der zu spaltenden Phosphodiesterbindung Endo- von Exonukleasen. Auch stellen die verschiedenen Nukleasen unterschiedliche Ansprüche an die Struktur oder Sequenz ihrer Substrate (z.B. Einzelstrang vs. Doppelstrang, Basenpräferenzen). So lassen sich weitgehend substrat- und sequenzunspezifische Nukleasen, für die die bovine pankreatische DNase I (Suck & Oefner, 1986) sowie die in dieser Arbeit vorgestellte Nuklease aus *Serratia marcescens* Beispiele sind, von z.T. sehr spezifischen bakteriellen Restriktionsendonukleasen unterscheiden, die DNA lediglich innerhalb einer definierten Erkennungssequenz zu spalten vermögen (Roberts & Halford, 1993; Pingoud & Jeltsch, 1997; Jeltsch & Pingoud, 2001). Ein Extrem bezüglich ihrer Spezifität sind die sog. *Homing*-Endonukleasen, die durch Gene mit

mobilen, selbst-spleißenden Introns codiert werden und auch in Inteinen gefunden wurden (Cooper & Stevens, 1995; Belfort & Roberts, 1997; Chevalier *et al.*, 2001), und deren Erkennungssequenzen generell sehr lang sind (14 – 44 Basenpaare).

### 1.1.1 Biologische Funktion von Nukleasen

Die Funktion der natürlich vorkommenden Nukleasen ist vielfältig und z.T. noch nicht vollständig verstanden. Nachfolgend seien die wichtigsten Funktionen genannt:

- Die **Restriktion von Fremd-DNA**, z.B. viralen Ursprungs, durch Restriktionsendonukleasen ist wohl die bekannteste Funktion von Nukleasen, da diese Enzyme sich aufgrund ihrer Fähigkeit, spezifische Sequenzen fremder DNA zu spalten, zu unentbehrlichen Werkzeugen in der Molekularbiologie entwickelt haben (Pingoud *et al.*, 1993; Eun, 1996). Restriktionsendonukleasen werden von Bakterien gebildet, deren eigene DNA dabei durch Modifizierungen wie beispielsweise durch Methylierung gegen Restriktion geschützt ist.
- **Nukleinsäuremetabolismus:** Da die Synthese von Nukleinsäuren metabolisch sehr aufwendig ist, nutzen einige Prokaryonten extrazelluläre Nukleasen, um Nukleinsäurebausteine aus dem umgebenden Raum wiederverwerten zu können. Als Kohlenstoffquelle scheinen Nukleinsäuren nicht unbedingt geeignet zu sein, doch ist beispielsweise für *Serratia marcescens*, deren Nuklease Thema dieser Arbeit ist, gezeigt worden, daß dieses Bakterium unter Laborbedingungen fähig ist, auf DNA als alleiniger Kohlenstoffquelle langsam zu wachsen (Beliaeva *et al.*, 1976).

Sezerniert werden auch die pankreatischen Verdauungsenzyme höherer Eukaryonten (Moore, 1981), während der Nukleinsäuremetabolismus selbst hauptsächlich intrazellulär stattfindet.

- Bei der **Replikation** treten Nukleasen als Topoisomerasen auf, die DNA winden oder entwinden können (Wang, 1982). Weiterhin sollen sie eine Rolle bei der Initiation der mitochondrialen Replikation spielen, wie beispielsweise die bovine Endonuklease G (Ruiz-Carillo & Côté, 1993), während die Exonuklease-Aktivitäten als Teil von DNA-Polymerasen der Fehlerkorrektur im *proofreading*-Prozeß dienen (Goodman & Bloom, 1993).
- Eine große Zahl von Nukleasen ist an **Rekombinationsprozessen** beteiligt (Sadowski, 1982), wie beispielsweise die gut untersuchte  $\gamma\delta$ -Resolvase (Yang & Steitz, 1995; Boocock *et al.*, 1995) sowie das RecBCD-System (Tainer *et al.*, 1995).

- **DNA-Reparatur:** Auch an der Reparatur von DNA sind eine Vielzahl von Nukleasen beteiligt, die neben anderen Proteinen oft in einem größeren Enzymkomplex verbunden sind. Beispielfhaft sei hier das *mismatch*-Reparatursystem MutHLS aus *Escherichia coli* (Grilley *et al.*, 1990; Modrich, 1994) genannt.
- In Prozesse der **Konjugation** und **Transformation** in Bakterien sind Nukleasen insofern involviert, daß sie einen Strang der doppelsträngigen DNA abbauen, bevor der auf diese Weise generierte Einzelstrang in eine Nachbarzelle eindringen kann (Lacks & Greenberg, 1973).
- Sezernierte Nukleasen können auch als **Bakteriocine** gegenüber konkurrierenden Mikroorganismen wirken. Berichtet ist dies z.B. für die Nuklease aus *Streptococcus pneumoniae* (Puyet *et al.*, 1990). Daneben wird eine Funktion von Nukleasen als **Virulenzfaktoren** vermutet, so beispielsweise bei der Nuklease aus *Vibrio cholerae*, die durch den Abbau von DNA im Sekret der menschlichen Lunge die Anheftung von Bakterien und damit eine Infektion erleichtern könnte (Focareta & Manning, 1991), sowie bei der Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* (Bisno, 1995).
- Bei der **Apoptose**, dem programmierten Zelltod, kommt den Nukleasen die Aufgabe der durch eine Reihe von Signalkaskaden aktivierten Fragmentierung und Degradierung des Chromatins zu (Peitsch *et al.*, 1993; Zhivotovsky *et al.*, 1994). In menschlichen Zellen ist eine entsprechende Aktivität der Nuklease DFF40/CAD zugeordnet worden (Counis & Torriglia, 2000).
- **Prozessierung und Abbau von RNA:** Die meisten in der Zelle vorkommenden RNA-Moleküle werden durch Prozessierungsreaktionen in ihre biologisch aktive Form überführt, an denen sowohl Ribozyme als auch RNasen beteiligt sind (Deutscher, 1993; Wahle, 1995). Durch den gezielten Abbau von mRNA sind Nukleasen in diesem Zusammenhang auch an der Genregulation beteiligt, indem auf diese Weise die Konzentration bestimmter Genprodukte kontrolliert wird.

## 1.2 Die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens*

### 1.2.1 Eigenschaften und Struktur

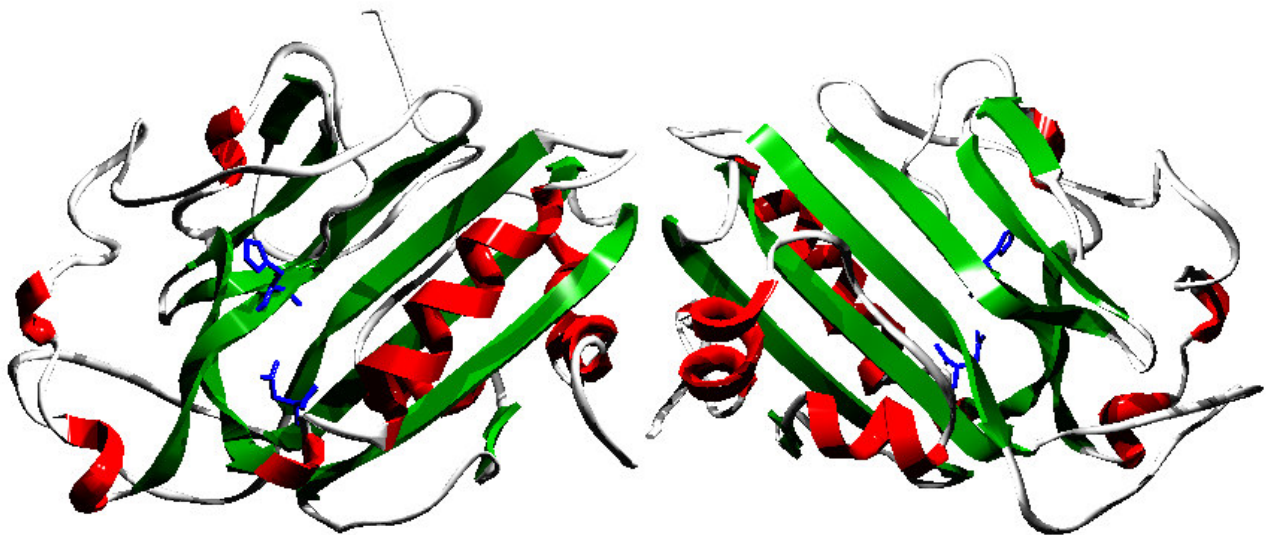
Das gram-negative, pathogene Enterobakterium *Serratia marcescens* produziert eine Reihe von Enzymen, die ins Medium sekretiert werden, darunter zwei Proteasen (Braun & Schmitz, 1980; Molla *et al.*, 1987), zwei Lipasen (Heller, 1979), zwei Chitinasen (Jones *et al.*, 1986) sowie eine Nuklease (E.C. 3.1.30.2), die 1963 zum ersten Mal beschrieben wurde (Eaves & Jeffries, 1963; für einen Überblick siehe Benedik & Strych, 1998).

Die Nuklease wird als 266 Aminosäuren langes Präprotein gebildet. Bei der Sezernierung in den Extrazellularraum wird ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren Länge abgespalten, so daß das reife Protein aus 245 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 28 kD besitzt. Während dieser Translokation werden im oxidativen Milieu des Periplasmas zwei für die Aktivität der Nuklease essentielle Disulfidbrücken ausgebildet (Ball *et al.*, 1992). Auf diese Weise wird eine Spaltung eigener bakterieller Nukleinsäuren verhindert. Zudem wird intrazellulär kein Inhibitor benötigt, wie es beispielsweise bei der ebenfalls unspezifischen und nahe verwandten Nuklease aus *Anabaena spec.* erforderlich ist (Muro-Pastor *et al.*, 1997; Meiss *et al.*, 1998). Es existieren mehrere Isoformen der Nuklease (Yonemura *et al.*, 1983; Pedersen *et al.*, 1993, 1995; Suh *et al.*, 1995), die sich jedoch in ihren enzymatischen Eigenschaften nur geringfügig unterscheiden (Filimonova *et al.*, 1994).

Die Nuklease stellt ein unspezifisches Enzym dar, das sowohl doppel- als auch einzelsträngige DNA sowie RNA hydrolysiert, um 5'-phosphorylierte Tetra-, Tri-, Di- sowie in nur geringem Maße Mononukleotide zu bilden (Nestle & Roberts, 1969a,b). Obwohl keine ausgeprägte Substratspezifität besteht und natürlich vorkommende Nukleinsäuren mit etwa gleicher Effizienz gespalten werden (Nestle & Roberts, 1969b; Yonemura *et al.*, 1983), sind einige einzelsträngige Homopolynukleotide resistent gegenüber einer Spaltung (Yonemura *et al.*, 1983). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß die *Serratia* Nuklease doppelsträngige Nukleinsäuren, die eine A-Form ähnliche Konformation annehmen können, präferentiell spaltet (Meiss *et al.*, 1999). So werden beispielsweise d(A)-d(T)-tracts in doppelsträngiger DNA kaum gespalten, während d(G)-d(C)-tracts die bevorzugten Spaltstellen darstellen (Meiss *et al.*, 1995). Der Zweck einer begünstigten Bindung und Spaltung von Substraten in A-Konformation könnte sein, daß auf diese Weise sichergestellt wird, daß sowohl RNA als auch DNA, die beide unter bestimmten

Bedingungen die A-Form annehmen können, in die Bindungstasche des Enzyms aufgenommen werden kann (Meiss *et al.*, 1999).

Das Enzym benötigt als Cofaktor  $Mg^{2+}$  in Konzentrationen von 5 bis 10 mM, welches nur bedingt durch andere zweiwertige Metallionen wie  $Mn^{2+}$  ersetzt werden kann (Nestle & Roberts, 1969a; Yonemura *et al.*, 1983; Friedhoff, 1995). Es ist in einem weiten pH-Bereich von pH 7-10 aktiv (Nestle & Roberts, 1969a), besitzt jedoch die größte Aktivität bei pH 8.0 (Yonemura *et al.*, 1983). Ebenfalls über einen weiten Bereich erstreckt sich die Temperaturtoleranz: Bei 4 °C bis 50 °C ist die Nuklease aktiv (Ahrenholtz *et al.*, 1994). Das Enzym zeichnet sich durch eine große Stabilität gegenüber einigen denaturierenden Agenzien wie z.B. Harnstoff oder Mercaptoethanol aus (Yonemura *et al.*, 1983; Merck, 1989). Dies und die große spezifische Aktivität der Nuklease hat dazu geführt, daß die *Serratia* Nuklease u.a. von der Firma Merck unter dem Handelsnamen Benzonase® kommerziell vertrieben wird. Sie wird zur Entfernung von Nukleinsäuren aus biochemischen Präparaten sowie für *footprint*-Analysen eingesetzt (Merck, 1989, 1993, 1995). Ferner wurde daran gearbeitet, auf der Basis einer immobilisierten Variante der *Serratia* Nuklease einen Biosensor zur hochempfindlichen Detektion von Nukleinsäuren zu entwickeln (Franke, 1998; Gast *et al.*, 2001).

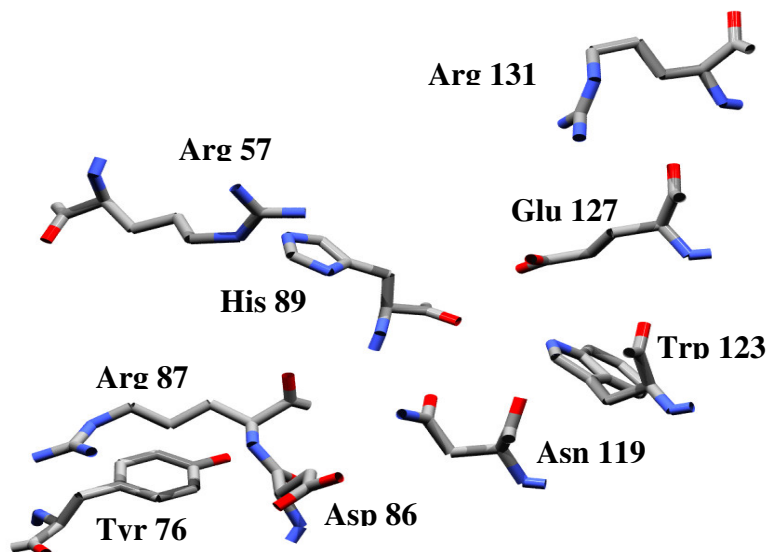


**Abb. 1-1:** Struktur des Homodimers der *Serratia* Nuklease mit  $\alpha$ -Helices (rot),  $\beta$ -Faltblättern (grün) und *loops* (grau). Zur Kennzeichnung der Lage der aktiven Zentren sind die essentiellen Aminosäuren His89 und Asn119 blau hervorgehoben. Die Koordinaten entsprechen dem PDB-Eintrag 1SMN (Miller *et al.*, 1994).

Seit der ersten erfolgreichen Kristallisation der Nuklease vor 10 Jahren (Miller *et al.*, 1991) ist es inzwischen gelungen, die atomare Struktur des Enzyms mit einer Auflösung von 1.1 Å zu bestimmen (Shlyapnikov *et al.*, 2000). Dagegen existiert bis heute keine Cokristallstruktur der Nuklease mit einem Substrat. Das Protein enthält zentral ein 6-strängiges  $\beta$ -Faltblatt, das auf beiden Seiten von helicalen Bereichen und langen *loop*-Regionen flankiert wird (**Abb. 1-1**). Das Enzym liegt als Homodimer vor (Filimonova *et al.*, 1981; Miller & Krause, 1996), wobei zwar die aktiven Zentren beider Monomere unabhängig voneinander funktionieren, mit hochmolekularer DNA jedoch größere Enzym-Substrat-Netzwerke ausbilden können, so daß eine Art prozessiver Spaltung möglich wird (Franke *et al.*, 1998, 1999a,b). Dies würde einer vermuteten nutritiven Funktion dieser Nuklease gerecht werden, doch auch eine Aufgabe als Bakteriocin zur Bekämpfung konkurrierender Mikroorganismen ist nicht auszuschließen.

### 1.2.2 Das aktive Zentrum der *Serratia* Nuklease

Ausgehend von Sequenzvergleichen mit lediglich drei verwandten Enzymen aus *Anabaena* sp. (Muro-Pastor *et al.*, 1992), *Saccharomyces cerevisiae* (Vincent *et al.*, 1988) sowie *Bos taurus* (Ruiz-Carrillo & Côté, 1993) wurden noch vor Bekanntwerden der Struktur der *Serratia* Nuklease konservierte Aminosäurereste ausgewählt, deren Funktion durch Mutationsanalysen charakterisiert werden sollte (Friedhoff *et al.*, 1994b). Mittlerweile konnten mit Hilfe weiterer funktioneller (Friedhoff, 1995; Friedhoff *et al.*, 1996b; Kolmes *et al.*, 1996) und struktureller (Miller *et al.*, 1994; Miller & Krause, 1996; Lunin *et al.*, 1997; Shlyapnikov *et al.*, 2000) Studien insgesamt 9 Aminosäuren identifiziert werden, die das aktive Zentrum der Nuklease bilden und am Katalysemechanismus des Enzyms beteiligt sind (**Abb. 1-2**; s. auch Kap. 4.2.2.1).



**Abb. 1-2:** Struktur des aktiven Zentrums der *Serratia* Nuklease mit den vermutlich an der Katalyse beteiligten Aminosäuren (Koordinaten nach Miller *et al.*, 1994).



Die für die Funktion wichtigsten Aminosäurereste sind das Histidin an der Position 89 sowie das Asparagin 119. Ein Austausch dieser Aminosäuren ist mit großen Aktivitätsverlusten bis hin zu einer vollständigen Inaktivierung der entsprechenden Mutanten verbunden (Friedhoff *et al.*, 1994, 1996b). Noch zu Beginn dieser Arbeit wurde die Funktion des His89 kontrovers diskutiert: Während wichtige Mutagenese- und andere Studien (Friedhoff *et al.*, 1994b, 1996b; Miller *et al.*, 1994) den Schluß nahelegen, daß diese Aminosäure als allgemeine Base fungiert, die durch die Abstraktion eines Protons ein Wassermolekül aktiviert, welches dann wiederum als Nukleophil die Phosphatgruppe einer zu spaltenden Bindung angreifen kann, wurde für eine solche Funktion auch die Aminosäure Glu127 vorgeschlagen (Antosiewicz *et al.*, 1997; Lunin *et al.*, 1997) (s. auch Diskussion in Kap. 4.2.2.1). Der entstehende pentakovalente Übergangszustand wird wahrscheinlich durch das positiv geladene Arg57, daneben aber auch durch ein als Cofaktor dienendes  $Mg^{2+}$ -Ion stabilisiert. Letzteres wird, wie neuere strukturelle Untersuchungen zeigen, oktaedrisch umgeben von 5 Wassermolekülen und der Seitenkette des Asn119, das damit die einzige und wichtigste direkte Koordinationsstelle zwischen Protein und Cofaktor ausbildet (Miller *et al.*, 1999). Die zunächst als Metallionen-Liganden favorisierten sauren Aminosäuren Asp86 und Glu127 sind dagegen lediglich indirekt über Asn119 bzw. ein Wassermolekül an der Magnesiumbindung beteiligt (Miller *et al.*, 1999).

Die basischen Aminosäuren Arg87 und Arg131 sind durch einen Kontakt mit den Phosphatgruppen 3' bzw. 5' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung maßgeblich an der Bindung eines Substrates beteiligt (Friedhoff *et al.*, 1996b). Wie die Protonierung der Abgangsgruppe erreicht wird, ist zur Zeit noch unbekannt; in Frage dafür kommt ein durch Glu127 aktiviertes Wassermolekül des Lösungsmittels oder eines aus der Hydrations-sphäre des  $Mg^{2+}$ , wie es für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *EcoRV* angenommen wird (Jeltsch *et al.*, 1993). Alternativ hierzu kann auch die Assoziation des Metallions an die negativ geladene Abgangsgruppe deren Ablösung erleichtern, wie es für die 3'→5' Exonuklease der Klenow-Polymerase diskutiert wurde (Beese & Steitz, 1991).

Für die konservierten aromatischen Aminosäuren Tyr76 und Trp123 wird eine Beteiligung an der Substratbindung vermutet (s. auch diese Arbeit, Kap. 3.5), nachdem ausgeschlossen werden konnte, daß diese Reste für die Spaltpräferenzen der *Serratia* Nuklease verantwortlich sind (Meiss *et al.*, 1999, 2000).

### 1.2.3 Die *Serratia* Nuklease-Familie der DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen

Die Nuklease aus *Serratia marcescens* gehört zu einer stetig wachsenden Gruppe homologer Zucker-unspezifischer Nukleasen, deren Mitglieder in allen Organismengruppen zu finden sind. Zu ihnen gehören Enzyme aus Eukaryonten, wie die mitochondriale Nuklease aus *Saccharomyces cerevisiae* (Vincent *et al.*, 1988), sowie Endonukleasen aus *Bos taurus* (Ruiz-Carillo & Côté, 1993), *Mus musculus* (Prats *et al.*, 1997) und *Homo sapiens* (Tiranti *et al.*, 1995). Homologe Proteine wurden u.a. entdeckt in dem Cyanobakterium *Anabaena sp.* (Muro-Pastor *et al.*, 1992, Meiss *et al.*, 1998) und dem Schleimpilz *Syncephalostrum racemosum* (Chen *et al.*, 1993). Zusätzlich sind offene Leseraster (ORFs, *open reading frames*) mit teilweiser Homologie in *Caenorhabditis elegans*, *Schizosaccharomyces pombe* und *Trypanosoma brucei* gefunden worden (Meiss *et al.*, 1998). Alle diese Enzyme sind durch das Motiv D-R-G-H-[QIL]-X<sub>3</sub>-A (PROSITE-Motiv PDOC00821) gekennzeichnet, das in der Aminosäuresequenz der Proteine hoch konserviert vorliegt (**Abb. 1-3**). Allen gemeinsam ist außerdem die Abhängigkeit ihrer katalytischen Aktivität von divalenten Metallionen. Bis heute ist die *Serratia* Nuklease das einzige Enzym dieser Gruppe, für das Strukturinformationen vorhanden sind. Gleichzeitig ist es das am besten charakterisierte Mitglied der Familie, so daß es als Paradigma der unspezifischen Nukleasen dieser Gruppe gilt.

Daneben wurde eine teilweise Sequenzhomologie zumindest derjenigen Aminosäuren, die das aktive Zentrum der *Serratia* Nuklease bilden, zu einer anderen Gruppe von Nukleasen aufgedeckt, die mit der an der bakteriellen Konjugation und Transformation beteiligten Nuklease aus *Streptococcus pneumoniae* (Puyet *et al.*, 1990) verwandt sind (**Abb. 1-3**). Für diese Nuklease-Familie wird dementsprechend ein der *Serratia* Nuklease ähnliches aktives Zentrum sowie ein ähnlicher Mechanismus der Phosphodiestererspaltung angenommen (Friedhoff *et al.*, 1999b). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, daß für ein Mitglied der Familie, die Nuklease aus *Streptococcus pyogenes*, schon gezeigt werden konnte, daß ein Histidin-Rest essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms ist (Iwasaki *et al.*, 1997).

<i>Serratia marcescens</i>	LKVDRGHQAPLASLAG-----VSDWESLNYL-SNITPQKSD-LNQ--GAWARLEDOERKLI : 134
<i>Homo sapiens</i>	SGFDRGHLAAANHRWS-----QKAMDDTFYL-SKVAPQVTH-LNQ--NAWNNLEKYSRSLT : 187
<i>Bos taurus</i>	SGFDRGHLAAANHRWS-----QKAMDDTFYL-SNVAPQVPH-LNQ--NAWNNLEKYSRSLT : 189
<i>Mus musculus</i>	SGFDRGHLAAANHRWS-----QKAMDDTFYL-SNVAPQVPH-LNQ--NAWNNLEKYSRSLT : 184
<i>Caenorhabditis elegans</i>	SGFDRGHLAAAGNHRKS-----QLAVDQTFYL-SNMSPQVGRGFNR--DKWNDLEMHCRVA : 640
<i>Drosophila melanogaster</i>	SGFDRGHLAAAGNHHLQ-----QNHCEDTFYL-TNIAPOVGQGFNR--SAWNNLEQYVRNLV : 129
<i>Cunninghamella echinulata</i>	SGFDRGHMAPAGDAVAT-----QPAMDQTFYL-SNMSPQVGIGFNR--HYWAYLEGFCRSLT : 134
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SGYDRGHQAPAADAKFS-----QKAMDDTFYL-SNMCPOVGEFNR--DYWAHLEYFCRGLT : 185
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SGYDRGHQVPAADCKFS-----QEAMNETFYL-SNMCPOVGDFNR--NYWAYFEDWCRRLT : 189
<i>Trypanosoma brucei</i>	RGLSRGHLAAQFHKS-----TVELAQTFNMNANTVPQDMT-MNA--VDWLRLENLTRKLR : 268
<i>Borrelia burgdorferi</i>	SGYDRGHIVSSADMSFS-----ENAMKDTYFL-SNMSPQKSE-FNS--GIWLKLEKLVREWA : 91
<i>Campylobacter jejuni</i>	SGYTRGHITAPNASFSXX-----KAAQNSVFLM-SNITPQNAQ-INK--KIWNXIEQERENLA : 84
<i>Anabaena sp.</i>	SGYDRGHIAPSADRTKT-----TEDNAATFLM-TNMMPQTPD-NNR--NTWGNLEDYCRELV : 170
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ASFDKCHMVRREDPGWDSDAVARQAEDDTFVY-TNAVPOVAQ-LNQ--RSWLSLEDYVLQNA : 513
<i>Rhizobium sp.</i>	NYFDRGHLVRLDPVWG-EIRVAKQANDTFQW-TNCSPQYWG-F--QGADLWQGLEFLLNYT : 541
<i>Gallus gallus</i>	TGLNRGHLNPSGHHSDS-----SSRAATFSL-TNIVPQNEK-LNG--GAWNNYEQOTMMRR : 187
<i>Streptococcus pyogenes Nuc3</i>	-VMNRGHLVGY-----QFCGLNDEP-RNLVAMT-AWLTGTGAYSGANDSNPEGMLY : 162
<i>Streptococcus pyogenes Nuc2</i>	-LMNRGHLVGY-----QFSGLNDEP-KNLVTMT-KYLTGTGFS-----DKNPLGLMLY : 161
<i>Enterococcus faecalis</i>	-NHSRGHLIGR-----QMGGSGDDP-RNLTTLYQNPVNTPYM-----TK : 149
<i>Streptococcus equisimilis</i>	-HLFVASHLFA-----DSLGGKSIR-KNAITGT-QMONVGTR-----KGGMOY : 217
<i>Streptococcus pyogenes Nuc1</i>	-YLFDRSHLIA-----DSLGGRPFR-NNLITGT-RTQNVGNN-----DRKGGMOY : 223
<i>Streptococcus pyogenes MF25</i>	-DFWNRSHLIA-----DSLGGDALR-VNAVGTGT-RTQNVGGR-----DQKGGMRY : 200
<i>Streptococcus pyogenes Nuc4</i>	-AVDRGHLGYA-LVGG-----LKGFDASTGNP-DNIATQL-SWANQANK-----PYLTGQNY : 109
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-AVDRGHLGYA-LIGG-----LDGFDASTSNP-KNIAVQT-AWANQQAQ-----EYSTGQNY : 203
<i>Physarum polycephalum</i>	-TCTASHLCH-NT-----RCHNP-LHLCWES-LDDNK-GRNWCPCP----- : 128
<i>Didymium iridis</i>	-TFHSSHLCKGDG-----SCMEL-KHTLRVP-AQTNLADHELCPAF----- : 205
<i>Naegleria andersoni</i>	-ARTISHLCG-NG-----GCARP-GHLRIEK-KTVND-ERTHCHFILL-RRSQS : 216

**Abb. 1-3:** Aminosäure-Sequenzvergleich der vermutlichen aktiven Zentren von drei verschiedenen Nuklease-Familien: Oben die Familie der DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen des *Serratia*-Typs, in der Mitte die zur Nuklease von *Streptococcus pneumoniae* homologen Enzyme und unten Vertreter der Cys-His-box-Homing-Endonukleasen. Konservierte Aminosäuren innerhalb einer Gruppe sind jeweils grau unterlegt, das in allen genannten Proteinen streng konservierte und katalytisch relevante Histidin und das Asparagin sind schwarz unterlegt (verändert nach Friedhoff *et al.*, 1999b).

Überraschend war die jüngst entdeckte große strukturelle Ähnlichkeit der aktiven Zentren der *Serratia* Nuklease und der Homing-Endonuklease I-PpoI aus dem Schleimpilz *Physarum polycephalum* (Friedhoff *et al.*, 1999a,b; Flick *et al.*, 1998). Trotz der sehr unterschiedlichen Gesamtstruktur beider Proteine ergibt sich bei der Überlagerung der Hauptketten von 23 Aminosäuren in der Region um das aktive Zentrum eine mittlere Abweichung von lediglich 1.14 Å (Friedhoff *et al.*, 1999b). Dabei zeigt sich die gleiche geometrische Anordnung der katalytisch wichtigen Seitenketten der Aminosäurereste His89, Asn119 und Arg57 der *Serratia* Nuklease, die den Aminosäuren His98, Asn119 und Arg61 in I-PpoI entsprechen, sowie der Magnesium-Koordinationssphäre (Miller *et al.*, 1999). Obwohl ansonsten keine Sequenz- und Strukturhomologie zwischen beiden Nukleasen besteht, haben diese Enzyme doch ähnliche biochemische Eigenschaften wie das pH-Optimum, die Reaktionsprodukte mit 5'-Phosphaten sowie die Abhängigkeit ihrer Aktivität von divalenten Metallionen wie  $Mg^{2+}$  (Wittmayer & Raines, 1996). Aus diesen Gründen wurde postuliert, daß beide Enzyme den gleichen

Mechanismus zur Spaltung von Phosphodiesterbindungen nutzen (Friedhoff *et al.*, 1999a,b; Mannino *et al.*, 1999; Galburt *et al.*, 1999), wobei ein Histidin als allgemeine Base das angreifende Wassermolekül aktiviert und ein zweites Wassermolekül, möglicherweise aus der Hydrathülle des  $Mg^{2+}$ -Ions, die Abgangsgruppe protoniert, während die Guanidiniumgruppe eines Argininrestes bzw. das  $Mg^{2+}$ -Ion den Übergangszustand stabilisiert. Bestärkt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß beide Nukleasen das in dieser Arbeit beschriebene artifizielle Minimalsubstrat Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (s. Kap. 3.3) an der gleichen Position und mit vergleichbarer Aktivität umsetzen (Friedhoff *et al.*, 1999b). Weiterhin haben neuere Mutagenesestudien an I-*PpoI* die Bedeutung der Aminosäurereste Arg61, His98 und Asn119 für die Katalyse bestätigt (Mannino *et al.*, 1999).

Die Ähnlichkeit der aktiven Zentren sowie die funktionellen Übereinstimmungen bei diesen Nukleasen sind umso bemerkenswerter, wenn man bedenkt, daß es sich bei beiden Enzymen um Proteine mit einer sehr unterschiedlichen Funktion handelt: Während die Nuklease aus *Serratia marcescens* eine unspezifische Nuklease ist, die Nukleinsäuren weitgehend Zucker- und Basen-unspezifisch hydrolysiert, ist I-*PpoI* wie alle *Homing*-Endonukleasen sehr spezifisch, so daß lediglich doppelsträngige DNA und nur innerhalb einer langen, definierten Erkennungssequenz von 15 Basenpaaren gespalten wird (Muscarella & Vogt, 1989).

I-*PpoI* ist teilweise sequenzzhomolog zu zwei weiteren *Homing*-Endonukleasen der sog. His-Cys-box-Familie (Johansen *et al.*, 1993), bei denen ebenfalls die den Aminosäuren His98 und Asn119 in I-*PpoI* entsprechenden Reste konserviert vorliegen, während ansonsten keine signifikante Sequenzzhomologie zur *Serratia*-Familie der DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen besteht (Friedhoff *et al.*, 1999b) (**Abb. 1-3**). Aufgrund der umfassenden biochemischen und strukturellen Charakterisierung der *Serratia* Nuklease kann diese auch als Modell für die mögliche Funktion der aktiven Zentren dieser Familie von *Homing*-Endonukleasen dienen, für die bis heute wenige Informationen über den Mechanismus der Nukleinsäurespaltung vorliegen. Andererseits bieten die für I-*PpoI* schon vorhandenen Strukturinformationen über das Enzym im Komplex mit seinem kognaten Substrat (Flick *et al.*, 1998) aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem aktiven Zentrum der *Serratia* Nuklease die Möglichkeit, Hinweise darauf zu erhalten, wie ein Substratmolekül im Zentrum dieses Enzyms gebunden vorliegen könnte (Srivastava *et al.*, 1999) (s. Kap. 4.3.2.2).

Mit der 1999 veröffentlichten Struktur des Bakteriocins Colicin E9 (Kleanthous *et al.*, 1999) ist eine weitere Endonuklease identifiziert worden, deren Aminosäuren im aktiven Zentrum ebenso

angeordnet sind wie bei der *Serratia* Nuklease und der *Homing*-Endonuklease I-*PpoI* (Kühlmann *et al.*, 1999). Auch hier gibt es ein Histidin und ein Arginin, welche dem His89 und dem Arg57 der *Serratia* Nuklease entsprechen, während sich an der dem Asn119 entsprechenden Position ein weiteres Histidin befindet. Weiterhin ist bei der E9 DNase ein  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion an der Position des  $\text{Mg}^{2+}$ -Cofaktors der *Serratia* Nuklease und der I-*PpoI* lokalisiert. Trotz der sehr unterschiedlichen dreidimensionalen Struktur der drei Nukleasen besteht bei der Überlagerung von 22 Aminosäuren der aktiven Zentren zwischen der E9 DNase und der *Serratia* Nuklease lediglich eine mittlere Abweichung von 1.5 Å bzw. zwischen der E9 DNase und I-*PpoI* eine Abweichung von 1.2 Å. Das aktive Zentrum des Colicins E9 stellt gleichzeitig ein klassisches H-N-H-Motiv dar, das vormals nur in *Homing*-Endonukleasen gefunden wurde und zu deren Einteilung in vier Familien herangezogen wurde (Belfort & Roberts, 1997). Die Homologie der aktiven Zentren von *Serratia* Nuklease, I-*PpoI* und Colicin E9 läßt sich - wie kürzlich gezeigt wurde – auch auf die T4 Endonuklease VII erweitern (Raaijmakers *et al.*, 2001). Aufgrund der Ähnlichkeit der aktiven Zentren dieser unterschiedlichen Enzyme wurde schließlich vorgeschlagen, sie nach den Sekundärstruktur-Elementen, die deren aktive Zentren bilden, unter dem Namen „ $\beta\beta\alpha$ -Me-Familie“ zusammenzufassen (Kühlmann *et al.*, 1999).

### 1.3 Ziel der vorliegenden Arbeit

Wie oben aufgeführt wurde, gehört die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens* zu einer stets wachsenden Gruppe DNA/RNA-unspezifischer Nukleasen, zu der Vertreter aller Organismengruppen von Bakterien über Pilze bis hin zu Säugetieren gehören (Kap. 1.2.3). Evolutiv betrachtet scheint sich hier in den verschiedensten Organismengruppen und in Enzymen mit unterschiedlicher Struktur und Funktion ein ähnliches Motiv entwickelt zu haben, das für die Spaltung von Phosphodiesterbindungen in besonderer Weise geeignet ist. Zumindest in der Familie der DNA/RNA-unspezifischen Nukleasen ist die *Serratia* Nuklease dasjenige Enzym, das am intensivsten untersucht und über das infolgedessen die meisten Informationen struktureller und funktioneller Art vorliegen. So gilt diese Nuklease als Paradigma für die gesamte Familie unspezifischer Nukleasen des *Serratia*-Typs und kann gleichzeitig wichtige Hinweise auf die Funktionsweise von anderen Enzymen der  $\beta\beta\alpha$ -Me-Familie liefern.

Trotz der Erkenntnisse, die überwiegend aufgrund struktureller Untersuchungen und Mutagenese-Studien über die Beteiligung bestimmter Aminosäuren am Aufbau des aktiven Zentrums der *Serratia* Nuklease gewonnen werden konnten, blieben bezüglich des genauen Katalysemechanismus noch immer wichtige Fragen offen: Diese betrafen die kontrovers diskutierte Rolle der Aminosäuren His89 und Glu127 als Säure/Base-Paar während der Spaltung von Phosphodiesterbindungen (Friedhoff *et al.*, 1994b, 1996b; Miller *et al.*, 1994; Lunin *et al.*, 1997) sowie die Funktion des Cofaktors  $Mg^{2+}$  bei der Katalyse. Dies sollte mit Hilfe kinetischer Untersuchungen, u.a. unter Verwendung eines neuen Minimalsubstrates, sowie mittels weiterer Studien zur Metallionen-Abhängigkeit geklärt werden.

Eine weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sein könnten, um so die Bindungsregion der *Serratia* Nuklease näher lokalisieren zu können. Aufgrund der bis heute fehlenden Strukturdaten für einen Enzym-Substrat-Komplex gibt es bezüglich der Bindung von Nukleinsäuren an diese Nuklease bisher nur wenige Hinweise.

## 2 MATERIALIEN UND METHODEN

In dieser Arbeit angewandte gängige Standardverfahren der Mikro- und Molekularbiologie werden hier nicht detailliert beschrieben. Diesbezüglich sei auf die Laborhandbücher *Current Protocols in Molecular Biology* (Asubel *et al.*, 1987-2000), *Biochemistry Labfax* (Chambers & Rickwood, 1993) und *Molecular Biology Labfax* (Brown, 1991) sowie auf Methodenbücher wie beispielsweise Pingoud & Urbanke (1997) verwiesen.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien und Biochemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Feinchemikalien stammen von den Firmen Calbiochem (Bad Soden), Fluka (Buchs, CH), GibcoBRL (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätsmaterial wurde von der Firma QIAGEN (Hilden) bezogen. Von dieser Firma sowie von Macherey & Nagel (Düren) stammten auch die verwendeten Kits für die Plasmid-Präparation, für die Aufreinigung von PCR-Produkten sowie für die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.

#### 2.1.2 Enzyme und Biomoleküle

Restriktionsenzyme wurden mit den entsprechenden 10x-Puffern von den Firmen Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig), Eurogentec (Köln) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

*Pfu* DNA-Polymerase stammte von der Firma Stratagene (Amsterdam, NL), T4 DNA-Ligase von Boehringer-Mannheim (Mannheim) bzw. MBI Fermentas, T4 Polynukleotidkinase ebenfalls von MBI Fermentas, Shrimps Alkalische Phosphatase und DNase I von Amersham Pharmacia Biotech.

Heringsspermien-DNA wurde von Sigma, Hefe-RNA von Boehringer-Mannheim und [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]-ATP zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren wurde von der Firma NEN (Boston, USA) bezogen. Oligodesoxyribonukleotide, die als Primer in PCR-Reaktionen eingesetzt wurden, synthetisierte die Firma Interactiva (Ulm). Oligonukleotide mit abasischen Positionen wurden von metabion (Planegg-Martinsried) bezogen.

Das artifizielle Substrat Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat wurde freundlicherweise von Prof. B.A. Connolly, Newcastle, zur Verfügung gestellt bzw. von Dr. I. Franke synthetisiert (Franke, 1998). Desoxythymidin-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat konnte von der Firma Merck bezogen werden.

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden unter möglichst keimfreien Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die dabei verwendeten Geräte, Materialien und Lösungen wurden für 30 min bei einer Temperatur von 121 °C autoklaviert.

### 2.2.1 Nährmedien zur Bakterienkultur

Die Kultur von *E. coli*-Stämmen erfolgte in LB-Vollmedium (Luria & Human, 1952), dem das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 75 µg/ml zugesetzt wurde. Zur Herstellung von Selektivplatten wurde dem Medium 1.5 % (*w/v*) Bacto-Agar sowie 100 µg/ml Ampicillin zugegeben und es anschließend in Petrischalen gegossen.

Zur Kultur von *E. coli*-Zellen nach Elektrotransformation wurde SOC-Medium in folgender Zusammensetzung verwendet (1 l):

- 20.0 g Caseinhydrolysat
  - 5.0 g Hefeextrakt
  - 7.4 g NaCl
  - 3.6 g Glucose
  - 1.27 ml 40 % (*w/v*) Phytinsäure
- pH 7.0.



### 2.2.2 Escherichia coli-Stämme

Die folgenden Stämme des Bakteriums *Escherichia coli*, deren jeweiliger Genotyp angegeben ist, wurden zur Klonierung und Expression eingesetzt:

**LK111( $\lambda$ )** [ $r_k^- m_k^+$ , *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *tonA21*, *supE44*, *lacI<sup>q</sup>* YZ $\Delta$ M15, Hfr,  $\lambda^+$ ] (Zabeau & Stanley, 1982) wurde zur Klonierung von Mutanten der *Serratia* Nuklease verwendet. Es handelt sich um eine  $\lambda$ -lysogene Variante des Stammes LK111, die den  $\lambda cI$ -Repressor konstitutiv exprimiert. Plasmide mit Genen, die unter Kontrolle des  $\lambda P_L$ - oder  $\lambda P_R$ -Promotors stehen, können dadurch vermehrt werden, ohne daß es zur Expression der entsprechenden Gene führt.

**TGE900** [ $F^-$ , *su-1*, *ilv-1*, bio( $\lambda cIts857\Delta BamHI$ )] (Courtney *et al.*, 1984) exprimiert konstitutiv die temperatursensitive Variante  $\lambda cIts857$  des  $\lambda$ -Repressors. Bei der nicht-permissiven Temperatur von 28 °C wird die Transkription von Genen unter Kontrolle des  $\lambda P_L$ - oder  $\lambda P_R$ -Promotors reprimiert, wohingegen eine Temperaturerhöhung auf 42 °C die Inaktivierung des Repressors und damit eine Überexpression der auf entsprechenden Plasmiden codierten Proteine ermöglicht.

### 2.2.3 Der Plasmid-Vektor pHisNuc

Das in dieser Arbeit als Expressionsvektor verwendete Plasmid pHisNuc (Wende, 1995) trägt das Gen für die *Serratia* Nuklease mit einem zusätzlichen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag der Sequenz [Met(His<sub>6</sub>)GlySer], der die spätere Aufreinigung des Proteins mittels Affinitätschromatographie ermöglicht. Die vollständige Nukleinsäuresequenz des Nuklease-Gens ist im Anhang wiedergegeben (Kap. 7.1). Auf diesem Plasmid befindet es sich unter der Kontrolle des  $P_L$ -Promotors. pHisNuc enthält außerdem das  $\beta$ -Lactamase-Gen zur Ausbildung einer Ampicillinresistenz und einen *high copy number origin*.

## 2.2.4 Transformation von *E. coli*-Zellen

### 2.2.4.1 Bereitung TSS-kompetenter Zellen

Die TSS-Methode (TSS = *transformation and storage solution*) (Chung *et al.*, 1989) zur Herstellung von Bakterienzellen, die Plasmid-Vektoren mit einer höheren Ausbeute aufnehmen können als z.B. *E. coli*-Zellen es natürlicherweise vermögen, verwendet PEG und DMSO zur Vorschädigung der Zellen und Magnesium-Ionen zum Ladungsausgleich der DNA. Die Vorgehensweise ist die folgende:

- 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum werden mit 1 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft
- Wachstum der Bakterienkultur bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 0.5 OD<sup>600</sup>
- Zellernte durch Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 1000 x g
- Resuspension der Zellen in 10 ml eiskalter TSS (LB-Vollmedium mit 10 % (w/v) PEG 3300 oder 8000, 5 % (v/v) DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub> oder MgSO<sub>4</sub>, pH 6.0-6.5)
- Aliquotieren der Zellsuspension zu je 200 µl, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden

Die auf diese Weise vorbereiteten Zellen können sofort eingesetzt werden und behalten ihre Kompetenz bei Lagerung bei –70 °C für ca. 6 Monate.

### 2.2.4.2 Transformation TSS-kompetenter Zellen

- Zugabe von bis zu 2 µg Plasmidlösung zu einem Aliquot (200 µl) kompetenter Zellen und Inkubation für 60 min auf Eis
- Hitzeschock für 3 min bei 42 °C, anschließendes Abkühlen auf Eis
- Zugabe von 1 ml LB-Medium und Inkubation für 60 min bei 37 °C (LK111(λ)) bzw. 28 °C (TGE900)
- Zentrifugation für 2 min bei 10 000 x g, Abgießen des Überstandes
- nach Resuspension kann das Zellpellet auf Selektivplatten ausgestrichen werden
- Wachstum der Zellen je nach Stamm bei 28 °C oder 37 °C

### 2.2.4.3 Bereitung elektrokompenter Zellen

Bei der Elektrotransformation werden Plasmid-Vektoren unter Hochspannung in die Bakterienzellen gebracht. Der Vorteil dieser Methode ist die höhere Transformationseffizienz. Die Vorbereitung der Bakterienzellen erfolgt nach folgender Methode, bei der durch mehrmaliges Waschen Salzreste, die bei der Elektrotransformation stören könnten, entfernt werden:

- Animpfen von 1 l LB-Medium mit 50 ml einer über Nacht gewachsenen Vorkultur und Wachstum bei 37 °C bis zu einer Zelldichte von 1 OD<sup>600</sup>
- Inkubation für 30 min auf Eis in einem vorgekühlten Zentrifugenbecher
- Zellernte durch Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g für 15 min, Abgießen des Überstandes
- nach und nach werden die Zellen in insgesamt 1 l eiskalten Wassers resuspendiert, wobei sie immer auf Eis gehalten werden müssen
- Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g für 15 min, Abgießen des Überstandes
- Wiederholen der schrittweisen Resuspension in insgesamt 500 ml Wasser
- Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g für 15 min, Abgießen des Überstandes
- Resuspension der Zellen in 40 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung
- Zentrifugation bei 4 °C und 4000 x g für 15 min, Abgießen des Überstandes
- Resuspension der Zellen in 2 ml eiskalter 10 %iger Glycerinlösung
- Aliquotieren der Zellsuspension zu je 80 µl, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden

### 2.2.4.4 Elektrotransformation

Die für die Elektrotransformation verwendete DNA muß salz- und proteinfrei sein, was durch eine vorangegangene Ethanol-Fällung erreicht wird. Die Transformation erfolgt wie im Folgenden beschrieben:

- Vorkühlen sowohl der elektrokompenten Zellen und der DNA als auch der verwendeten Elektroporationsküvetten auf Eis
- Mischen von 10 pg-10 ng *sc* Plasmid-DNA mit 80 ml Zellsuspension

- Transformation in einem Elektroporator II (Invitrogen, USA) nach den Angaben des Herstellers für 5 ms bei einer Spannung von 1700 V
- Aufnehmen der Zellen in 1 ml SOC-Medium (s. Kap. 2.2.1) und Inkubation bei 28 °C oder 37 °C (je nach Stamm) für 1 h
- Zentrifugation für 2 min bei 10 000 x g, Abgießen des Überstandes
- nach Resuspension kann das Zellpellet auf Selektivplatten ausgestrichen werden
- Wachstum der Zellen je nach Stamm bei 28 °C oder 37 °C

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA im Kleinmaßstab wurde eine Minipräparation mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Aus einer 3 ml Bakterienkultur können hiermit Ausbeuten von bis zu 10 µg Plasmid erreicht werden.

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden durch alkalische Lyse und differentielle Nukleinsäurepräzipitation gewonnen (Birnboim & Doly, 1979; Ish-Horowicz & Burke, 1981). Nach dem folgenden Protokoll können etwa 300 µg Plasmid-DNA aus 500 ml Bakterienkultur isoliert werden.

- Zellernte: Zentrifugation der 500 ml Kultur: 4000 rpm, 15 min, 4 °C  
Waschen mit 40 ml STE-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)  
Zentrifugation: 4000 rpm, 15 min, 4 °C
- Lyse: Resuspension in 10 ml Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA) und 10 ml Lösung I mit 80 mg Lysozym  
Inkubation für 15 min bei RT  
Zugabe von 40 ml Lösung II (0.2 M NaOH, 1 % SDS)  
Inkubation für 10 min auf Eis

Zugabe von 30 ml Lösung III (36 ml 3 M Kaliumacetat, 11.5 ml 100 %ige Essigsäure, 28.5 ml H<sub>2</sub>O), Inkubation für 30 min auf Eis

Zentrifugation: 20 000 rpm, 20 min, 4 °C

Überstand filtrieren

- 1. Fällung: Zugabe von 0.6 vol. Isopropanol, Inkubation für 10 min bei RT  
Zentrifugation: 5000 rpm, 30 min, 4 °C  
Verwerfen des Überstandes, vollständiges Trocknen des Pellets  
Resuspension in 3 ml TE
- 2. Fällung: Zugabe von 3 ml 5 M LiCl  
Zentrifugation: 10 000 rpm, 10 min, 4 °C
- 3. Fällung: Mischen des Überstandes mit 1 vol. Isopropanol  
Zentrifugation: 10 000 rpm, 10 min, RT  
Waschen des Pellets mit 10 ml 70 %igem Ethanol  
Trocknen des Pellets  
Aufnehmen des Pellets in 500 µl TE mit 10 mg/ml RNase A  
Inkubation für 30 min bei RT
- 4. Fällung: Zugabe von 500 µl PEGS (1.6 M NaCl, 13 % (w/v) PEG 8000)  
Zentrifugation: 12 000 rpm, 5 min, 4 °C
- Extraktion: Trocknen des Pellets  
Aufnehmen in 400 µl TE  
Extraktion in 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24:24:1)  
Extraktion in 400 µl Chloroform
- 5. Fällung: Zugabe von 100 µl 10 M Ammoniumacetat zur wässrigen Phase  
Zugabe von 5 vol. 100 %igem Ethanol, Inkubation für 10 min bei RT  
Zentrifugation: 12 000 rpm, 5 min, 4 °C  
Waschen des Pellets mit 200 µl 70 %igem Ethanol  
Zentrifugation: 12 000 rpm, 5 min, 4 °C  
Trocknen des Pellets  
Aufnehmen in 200-500 µl Wasser, Lagerung bei –20 °C

## 2.3.2 Gelelektrophoretische Verfahren

### 2.3.2.1 Analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und Restriktionsfragmenten bis zu einer Länge von ca. 1000 bp erfolgte über 6 – 8 %ige TPE-Polyacrylamidgele (TPE: 80 mM Tris-Phosphat, 2 mM EDTA, pH 8.0) der Größe 10 x 10 x 0.1 cm. Die Nukleinsäurebanden wurden über Anfärbung mit einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) und über einem UV-Leuchttisch (Bachhofer Transilluminators, Reutlingen) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Videosystems der Firma INTAS, Göttingen, dokumentiert.

### 2.3.2.2 Analytische Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe von 0.8 %igen TBE-Agarosegelen (TBE: 100 mM Tris/Borat, pH 8.0, 2.5 mM EDTA) konnte die Spaltung von überspiralisierter Plasmid-DNA analysiert werden. Die Visualisierung der Nukleinsäurebanden erfolgte durch Anfärbung mit einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml). Anschließend wurden die Reaktionsprodukte mit einem INTAS-Videosystem dokumentiert und über das Programm TINA (Firma raytest) quantifiziert.

### 2.3.2.3 Präparative Agarosegelelektrophorese

Zur Aufreinigung von Plasmidfragmenten, die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I generiert wurden und die bei der Klonierung von Varianten des Nukleasegens als Rahmen dienen sollten, wurde ein präparatives 0.6 %iges TAE-Agarosegel (TAE: 40 mM Tris, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8.0) verwendet. Nach Anfärbung des Gels mit einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) und Visualisierung der Nukleinsäuren unter UV-Licht der Wellenlänge 312 nm erfolgt die Isolation der gewünschten Bande mit Hilfe des DNA-Extraktionskits *QIAEx* (QIAGEN, Hilden). Alternativ kann eine 0.6 %ige Agaroselösung mit Ethidiumbromid versetzt und in das fertige Gel eine Tasche geschnitten werden, die mit *low-melting*-Agarose gefüllt wird. Während der Elektrophorese kann nun das Einlaufen der gewünschten DNA-Bande in diesen Bereich mittels UV-Lampe kontrolliert werden. Das Gelstück wird ausgeschnitten und nach Zugabe von Wasser durch Inkubation bei 65 °C für 5 min verflüssigt. Anschließend wird die DNA mit dem *QIAquick DNA-Purification Kit* der Firma QIAGEN, Hilden, aufgereinigt.

#### 2.3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Proteinanalytik wurden 12.5 – 17.5 %ige diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele der Größe 10 x 10 x 0.1 cm verwendet (SDS-PAGE, Laemmli, 1970). Als Molekulargewichtsstandard wurde die Proteinmischung Merck IV mit Proteinbanden bei 12.4, 17.0, 30.0, 42.7, 66.3 und 77.8 kDa eingesetzt. Die Anfärbung der Proteinbanden erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

### 2.3.3 DNA-Modifikationen

#### 2.3.3.1 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Präparative Spaltungen von Vektoren zum Zwecke der Klonierung und analytische Spaltungen von PCR-Produkten wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers mit den entsprechenden Restriktionsenzymen und den mitgelieferten 10x-Puffern durchgeführt. Die Analyse der Spaltfragmente erfolgte über Gelelektrophorese (Kap. 2.3.2).

#### 2.3.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von *in vitro* generierten Varianten des Nuklease-Gens in Plasmidvektoren wurden 100 ng des zuvor mit geeigneten Restriktionsenzymen geöffneten Vektors mit einem 5 -10fachen Überschuß des zu ligierenden Fragments mit T4 DNA-Ligase entsprechend den Angaben des Herstellers inkubiert. Zur Elektrottransformation (Kap. 2.2.4.4) wurde die DNA unter Verwendung von Glykogen als Fällungshilfe mit 1 Volumenteil Ammoniumacetat und 4 Volumenteilen Ethanol gefällt, um vorhandene Salze zu entfernen. Für die TSS-Transformation (Kap. 2.2.4.2) kann der Ligationsansatz unmittelbar ohne weitere Aufreinigung eingesetzt werden.

### 2.3.3.3 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Zur Untersuchung der Spaltung kurzer Oligonukleotide mittels Homochromatographie (s. Kap. 2.6.3) und zur anschließenden Detektion der Spaltprodukte in einem InstantImager™ (Canberra Packard) wurde die DNA mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  radioaktiv markiert. In einer typischen Reaktion wurden 100 pmol Oligonukleotid in dem entsprechenden 10fach Puffer der Kinase mit 1.7 pmol (entspricht 5  $\mu\text{Ci}$ )  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und 5 U T4 Polynukleotidkinase für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde, um eine vollständige Phosphorylierung zu erreichen, ein Überschuß an nicht-radioaktivem ATP (10 nmol) zugegeben und für weitere 10 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Kinase durch Temperaturerhöhung auf 65 °C inaktiviert.

## 2.4 *In vitro*-Herstellung von Varianten der *Serratia* Nuklease

### 2.4.1 Ortsspezifische Mutagenese nach der 2-PCR-Methode

In dieser Arbeit wurde zur *in vitro*-Generierung von rekombinanten Genen der *Serratia* Nuklease mit gezielten Aminosäureaustauschen die 2-PCR-Methode angewandt (Friedhoff *et al.*, 1994b). Sie stellt eine Modifikation einer Methode von Ito *et al.* (1991) dar. Ausgangspunkt für die Mutagenese des *Serratia*-Gens ist das mit *Eco47I* vorlinearisierte Plasmid pATNuc (Wende, 1995), auf dem das Gen der *Serratia* Nuklease ohne Promotor vorliegt (Sequenz des Nuklease-Gens im Anhang Kap. 7.1). In einer ersten Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird mit Hilfe eines Mutagenese-Primers, der die gewünschte Mutation sowie eine zusätzlich eingeführte Restriktionsstelle trägt, zunächst ein Teilfragment des Gens amplifiziert, das in der folgenden zweiten PCR als „Megaprimer“ zur Synthese des gesamten Nuklease-Gens eingesetzt wird.

Die Sequenzen der verwendeten Primer wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Oligo™ (National Biosciences) generiert und sind im Anhang (Kap. 7.2) wiedergegeben. Im Folgenden sind die Zusammensetzung und die Bedingungen für die PCR-Reaktionen, die im Thermocycler Varius V der Firma Landgraf, Hannover, durchgeführt wurden, genannt.



**1.PCR** (50 µl-Ansatz):

	Menge / Konzentration
<i>Template</i> pATNuc x <i>Eco47I</i>	1 ng/µl
1.1.1.1.1 Primer LLE	400 nM
Mutagenese-Primer	400 nM
dNTPs	je 200 µM
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	1 x
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	0.025 U/µl

Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	15
Hybridisierung	62	60	
Primerextension	72	60	
Denaturierung	95	30	1
Hybridisierung	62	60	
Primerextension	72	300	
Abkühlung	4	∞	∞

**2.PCR** (50 µl-Ansatz):

	Menge / Konzentration
<i>Template</i> pATNuc x <i>Eco47I</i>	1 ng/µl
PCR-Produkt 1 (Megaprimer)	ca. 2 ng/µl
Primer LSE	400 nM
Primer 1602	400 nM
dNTPs	je 200 µM
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	1 x
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	0.025 U/µl

Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	5
Primerextension	72	60 <sup>1</sup>	
Denaturierung	95	30	
Hybridisierung	55	60	10
Primerextension	72	300	
Abkühlung	4	∞	∞

<sup>1</sup> Rampe von 180 sec

Die PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick PCR-Purification Kit* der Firma QIAGEN, Hilden, aufgereinigt.

Nach Kontrolle des 2. PCR-Produktes durch Markerspaltung mit dem entsprechenden Restriktionsenzym wurde es mit *Bam*HI und *Sal*I gespalten und in das zuvor mit den gleichen Enzymen geöffnete Plasmid pHisNuc einligiert. Mit den gewonnenen Plasmiden wurden mittels TSS- bzw. Elektrotransformation (s. Kap. 2.2.4) *E. coli*-Zellen des Stammes LK111(λ) transformiert.

### 2.4.2 Screening nach positiven Transformanden

Nach der Transformation und dem Wachstum der Bakterienzellen auf Selektivplatten wurden einige Klone auf die Anwesenheit der mit der Mutation eingeführten Markerschnittstellen getestet. Dazu wurde zunächst das Nukleasegen mit Hilfe einer PCR amplifiziert: Einzelne Klone wurden in 50 µl Wasser aufgenommen und durch gründliches Vortexen und kurzzeitiges Erhitzen auf 95 °C aufgeschlossen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in der folgenden PCR eingesetzt:

**Screening-PCR** (50 µl-Ansatz):

	Menge / Konzentration
Überstand Zellaufschluß	1 µl
Primer 67	400 nM
Primer LS	400 nM
DNTPs	je 200 µM
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer	1 x
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	0.025 U/µl

Prozeß	Temperatur [°C]	Zeit [sec]	Anzahl Zyklen
Denaturierung	95	180	1
Denaturierung	95	30	
Hybridisierung	55	60	25
Primerextension	72	60	
Abkühlung	4	∞	∞

Das Vorhandensein der gewünschten Mutation wird mit Hilfe einer Restriktionsspaltung überprüft und über analytische Polyacrylamid-Gelelektrophorese dokumentiert.

### 2.4.3 Sequenzierung

Zur Verifizierung einer gewünschten Mutation und um Sekundärmutationen auszuschließen, wurden die Gene der Nuklease-Varianten nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger & Coulson, 1975) auf der Basis fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleotide sequenziert. Die Sequenzierreaktion wurde dabei mit dem Produkt der *Screening*-PCR und dem PRISM™ *DyeDideoxy Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Firma Perkin-Elmer, Weiterstadt, auf einem 373A-DNA-Sequencer oder einem ABI CE 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Zur vollständigen Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters wurden die das *Serratia*-Gen flankierenden Primer 67 und LS sowie die

internen Primer 65 und 66 verwendet (Sequenzen im Anhang, Kap. 7.2). Die Vorbereitung der Proben und die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.4 Aufreinigung rekombinanter Varianten der *Serratia* Nuklease

Die in dieser Arbeit charakterisierten Mutanten der *Serratia* Nuklease wie auch das Wildtyp-Enzym wurden als rekombinante Proteine in *E. coli*-Zellen überexprimiert und denaturierend aufgereinigt (Friedhoff *et al.*, 1994b). Da sie hierbei als Fusionsproteine mit einem N-terminalen GlySer(His)<sub>6</sub>-Affinitäts-tag vorliegen, können sie mittels IMAC (*immobilized metal ion affinity chromatography*) von anderen Proteinen getrennt werden. Die gesamte Aufreinigung wurde kontrolliert und dokumentiert, indem nach jedem Schritt ein Aliquot der Lösung entnommen und über SDS-PAGE (Kap. 2.3.2.4) analysiert wurde.

##### 2.4.4.1 Expression von Nuklease-Varianten in *E. coli*-Zellen

Von Klonen, deren Gene sich aufgrund der Markerspaltung und Sequenzierung als positiv für die gewünschte Mutation herausgestellt hatten, wurde eine Minipräparation von Plasmid-DNA (Kap. 2.3.1) hergestellt. Diese diente zur Transformation des *E. coli*-Stammes TGE900, in dem die *Serratia* Nuklease überexprimiert werden sollte.

Dazu werden 500 ml Selektivmedium mit Ampicillin als Antibiotikum mit 1 ml einer 3 ml-Bakterienvorkultur angeimpft. Bis zu einer Dichte von 1 OD<sup>600</sup> wachsen die Zellen bei der permissiven Temperatur von 28 °C. Durch eine Temperaturerhöhung auf 42 °C wird die Expression des Nuklease-Gens, das unter Kontrolle des  $\lambda$ P<sub>L</sub>-Promotors steht, infolge der Inaktivierung des temperatursensitiven  $\lambda$ -Repressors induziert. Nach 1.5 h werden die Zellen durch Zentrifugation (4000 rpm, 10 min, 4 °C) geerntet und mit STE-Puffer (8 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA) gewaschen.

##### 2.4.4.2 Solubilisierung der Nuklease aus *inclusion bodies*

Stark überexprimierte Proteine, die in *Escherichia coli* in sog. *inclusion bodies* eingeschlossen werden, können aus diesen durch Denaturierung gewonnen werden (Friedhoff *et al.*, 1994a). Nach Ultraschallaufschluß der Zellen in 10 mM Tris/HCl, pH 8.2, 1 mM EDTA (Branson

Sonifier 250, *output level* 5, *duty cycle* 50 %, 5 x 15 sec) werden dazu die *inclusion bodies* von den übrigen Zellbestandteilen durch Zentrifugation (20 000 rpm, 60 min, 4 °C) getrennt und durch Inkubation in Harnstoff-haltigem Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.2, 6 M Harnstoff, 10 mM Imidazol) über Nacht solubilisiert. Nach weiterer Zentrifugation (20 000 rpm, 60 min, 4 °C) befindet sich das nunmehr gelöste Protein im Überstand.

#### 2.4.4.3 Aufreinigung der *Serratia* Nuklease über Affinitäts-Chromatographie

Als Säulenmaterial für die Affinitäts-Chromatographie als abschließendem Schritt der Proteinaufreinigung dient Nickel-NTA (*nitrilo-tri-acetic acid*) der Firma QIAGEN, Hilden. Es stellt einen Chelatkomplex dar, der immobilisiert an Sepharose vorliegt und aufgrund der komplexierten Nickel-Kationen eine sehr starke Affinität für Proteine aufweist, die an ihrem N- oder C-Terminus sechs aufeinanderfolgende Histidinreste tragen (Hochuli *et al.*, 1988).

Die Proteinlösung wird auf die Säule gegeben, die 1 ml Nickel-NTA enthält und mit Harnstoff-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.2, 6 M Harnstoff, 10 mM Imidazol) äquilibriert wurde. Zur vollständigen Bindung des Enzyms wird der Durchlauf insgesamt 3 mal auf die Säule gegeben, bevor mit 50 ml Harnstoff-Puffer gewaschen wird. Die Elution erfolgt mit 10 mM Tris/HCl, pH 8.2, 6 M Harnstoff, 200 mM Imidazol.

Zur Renaturierung der Nuklease wurde gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8.2 dialysiert, zentrifugiert und der Überstand mit dem Enzym bei 4 °C gelagert.

## 2.5 Spektroskopische Verfahren

### 2.5.1 UV-Spektroskopie zur Konzentrationsbestimmung

Die UV-Spektroskopie diente der Bestimmung von Nukleinsäure- und Proteinkonzentrationen. DNA-Konzentrationen wurden errechnet, indem mit einem Hitachi-U3000 UV-Spektrometer ein Spektrum im Wellenlängenbereich von 220 – 320 nm aufgenommen wurde. Die Berechnung der Konzentration erfolgt aufgrund der Annahme, daß für doppelsträngige DNA gilt:  $1 \text{ OD}^{260} = 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , für einzelsträngige DNA:  $1 \text{ OD}^{260} = 37 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Bei DNA-Präparationen kann die

Reinheit der Nukleinsäurelösung über das Verhältnis  $E^{260}/E^{280}$  abgeschätzt werden, das zwischen 1.6 und 1.8 liegen sollte.

Zur Bestimmung der Nukleasekonzentration wird aus einem Spektrum von 220 – 320 nm die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelt und zur Berechnung ein Extinktionskoeffizient  $\epsilon^{280}$  von  $45\,170\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  eingesetzt (Pace *et al.*, 1995).

### 2.5.2 CD-Spektroskopie

Die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie (Cantor & Schimmel, 1980; Freifelder, 1982) wird genutzt, um Aussagen über die Sekundärstruktur von Proteinen und somit über Strukturabweichungen von Enzymvarianten gegenüber dem Wildtyp-Protein machen zu können. Dies wird dadurch möglich, daß die verschiedenen Sekundärstrukturelemente aufgrund von Absorptionsunterschieden in zirkular polarisiertem Licht unterschiedliche Spektren ergeben.

Die Absorption wird in einem Jasco J-7710 Circular dichroismus-Spektrometer in zylindrischen Küvetten von 0.05 cm Schichtdicke bei einer Proteinkonzentration von  $5\text{ }\mu\text{M}$  in 10 mM Tris/HCl, pH 8.2 in einem Wellenlängenbereich von 190-250 nm ermittelt.

Die gemessene Elliptizität  $\Theta$  [mdeg] wird nach folgender Formel in die molare Elliptizität [ $\text{mdeg M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ] umgerechnet:

$$\Theta = \frac{100 \cdot \Theta}{c \cdot d}$$

Dabei stellt  $c$  die molare Konzentration der Aminosäuren in der Probe und  $d$  die Schichtdicke der verwendeten Küvette in cm dar.

## 2.6 Enzymologie

Nach der Aufreinigung neu generierter Nuklease-Varianten wurden diese hinsichtlich ihrer kinetischen und funktionellen Eigenschaften untersucht und mit dem Wildtyp-Enzym verglichen.

Dies erfolgte mit Hilfe verschiedener Aktivitätsassays, die im folgenden näher beschrieben werden.

### 2.6.1 Mikrotiterplatten-Aktivitätsassay

Dieser Aktivitätsassay für Nukleasen beruht auf der Abnahme der durch Interkalation hervorgerufenen Fluoreszenz von Ethidiumbromid bei fortschreitender Degradation von DNA (Friedhoff *et al.*, 1996c). Da der Assay in einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird, erlaubt diese Methode eine gleichzeitige Analyse von bis zu 96 Reaktionen innerhalb kürzester Zeit. Zur quantitativen Auswertung kann auf einem UV-Leuchttisch (Wellenlänge 312 nm) mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems (INTAS, Göttingen) die Fluoreszenzintensität zu verschiedenen Reaktionszeiten registriert und anschließend mit einem bildverarbeitenden Computerprogramm (COUNTER, S.E. Matzen) analysiert werden.

Der Assay wurde zunächst genutzt, um eine qualitative Voreinschätzung der Aktivität neu generierter Nuklease-Varianten vornehmen zu können. In diesem Fall enthält ein typischer Reaktionsansatz von 100 µl je *well* folgende Komponenten:

50 mM Tris/HCl, pH 8.2

5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.05 mg/ml hochmolekulare DNA aus Heringssperma

5 µM Ethidiumbromid

Das zu untersuchende Enzym wurde in verschiedenen Verdünnungsstufen hinzugegeben und die Reaktion bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### 2.6.1.1 Erstellen eines pH-Profiles

Weiterhin wurde der Mikrotiterplatten-Assay verwendet, um die quantitative nukleolytische Aktivität des Wildtyp-Enzyms und verschiedener Mutanten unter variierenden Bedingungen zu untersuchen und somit z.B. ein pH-Profil zu erstellen oder den Einfluß verschiedener Metallionen auf die Aktivität zu bestimmen. Für die Aufzeichnung des pH-Profiles der Mutante N119D wurden statt Tris-Puffer verschiedene, in den unten angegebenen pH-Bereichen puffernde Systeme in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt.

Natriumacetat	pH 4 – 5.9
MES/KOH	pH 5.8 – 6.5
HEPES/KOH	pH 7 – 8
Tris/HCl	pH 7 – 9
CAPS/HCl	pH 9.7 – 11.1

Die Puffer wurden durch Mischen der sauren und basischen Komponente jeweils als 2 x-Puffer hergestellt. Zum Ausgleich der Ionenstärke wurde NaCl in einer Konzentration von 40 mM zugesetzt. Die pH-Messung erfolgte an einem pH-Meter 761 (Knick, Berlin) bei Raumtemperatur. Die Nuklease-Variante N119D wurde in einer Endkonzentration von 4  $\mu$ M, der Wildtyp zum Vergleich zu 2 nM eingesetzt.

### 2.6.2 Hyperchromizitäts-Assay (Kunitz-Assay)

Die Aktivitätsbestimmung von unspezifischen Nukleasen mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays nach Kunitz (Kunitz, 1950) basiert auf der Zunahme der Absorption von UV-Licht mit 260 nm Wellenlänge, die sich durch die nukleolytische Spaltung von doppelsträngiger DNA in kürzere und schließlich einzelsträngige Fragmente ergibt. Aufgrund der nunmehr fehlenden *stacking*-Wechselwirkungen steigt die Absorption abhängig von der Art des Substrates um einen bestimmten Faktor an und ergibt einen hyperchromen Effekt, der bei hochmolekularer DNA maximal 30 % beträgt. Da ein Anstieg der UV-Absorption erst ab einer Produktlänge von ca. 10 bp auftritt, beobachtet man bei der Spaltung hochmolekularer Substrate zunächst eine kurze *lag*-Phase. Für den dann folgenden linearen Anstieg einer Umsatzkurve kann man jedoch vereinfacht davon ausgehen, daß ein linearer Zusammenhang zwischen der Zunahme der Hyperchromizität und der Zahl der gespaltenen Phosphodiesterbindungen besteht (Hale *et al.*, 1993).

Für die Bestimmung der nukleolytischen Aktivität der *Serratia* Nuklease und ihrer Mutanten wurde der Assay mit hochmolekularer DNA aus Heringsspermien in einer Konzentration von 0.05 mg/ml und 5 nM Enzym in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und einer Küvette von 1 cm Schichtdicke in einem Volumen von 120  $\mu$ l bei 25 °C durchgeführt. Die Reaktion wurde in einem U-3000 Spektrophotometer (Hitachi) durch die kontinuierliche Messung der Absorption bei 260 nm verfolgt.



Von der maximalen Steigung der Absorptionsrate ausgehend wurde die spezifische Aktivität der jeweiligen Proteinlösung in Kunitz-Units (K.U.) berechnet, wobei eine K.U. unter den genannten Bedingungen als die Nuklease-Aktivität definiert ist, die in einem Testvolumen von 1 ml bei einer Schichtdicke von 1 cm eine Steigerung der Absorption von  $0.001 A^{260}/\text{min}$  bewirkt (Kunitz, 1950).

### 2.6.2.1 Bestimmung der kinetischen Parameter $k_{\text{cat}}$ und $K_M$

Die katalytische Konstante  $k_{\text{cat}}$  und die Michaelis-Konstante  $K_M$  der Wildtyp-Nuklease und der Mutanten wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays (s.o.) bestimmt. Dazu wird als Substrat Heringsspermien-DNA in Konzentrationen zwischen  $5 \mu\text{M}$  und  $7 \text{ mM}$  in  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl, pH 8.2,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  eingesetzt. Die Absorptionsmessung erfolgt spektrophotometrisch in Quarzküvetten von 1 cm bzw. bei hohen DNA-Konzentrationen von 0.1 cm Schichtdicke bei Raumtemperatur. Die Endkonzentration des jeweiligen Enzyms wird so gewählt, daß aus der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm eine meßbare Anfangssteigung der Umsatzkurve bestimmt werden kann. Unter folgenden Annahmen, die wegen der großen Zahl möglicher Spaltstellen für unspezifischen Nukleasen gemacht werden müssen, können aus dieser Anfangsgeschwindigkeit apparente Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet werden (Hale *et al.*, 1993, Friedhoff, 1995): Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem hyperchromen Effekt und der Länge des Substrates und der Anzahl der gespaltenen Phosphodiesterbindungen angenommen. Weiterhin wird vereinfachend vorausgesetzt, daß am Ende der nukleolytischen Reaktion alle Phosphodiesterbindungen gespalten sind. Die apparente Geschwindigkeit  $v$  [ $\text{M}(\text{nt}) \text{ M}(\text{Enzym})^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ] läßt sich dann wie folgt berechnen:

$$v = \frac{A^{260} / \text{sec}}{\Delta A_{\text{max}}^{260}} \cdot \frac{c_{\text{DNA}}}{c_{\text{Nuklease}}}$$

Dabei ist  $A^{260}/\text{sec}$  die Anfangsgeschwindigkeit der gemessenen Absorptionsänderung,  $\Delta A_{\text{max}}^{260}$  der hyperchrome Effekt ( $A^{260}(t = \infty) - A^{260}(t = 0)$ ),  $c_{\text{DNA}}$  die Ausgangskonzentration der DNA in  $[\text{M}(\text{nt})]$  und  $c_{\text{Nuklease}}$  die Konzentration des jeweiligen Enzyms in  $[\text{M}]$ .

Aus dem Auftrag der berechneten apparenten Geschwindigkeiten  $v$  [ $\text{sec}^{-1}$ ] gegen die jeweilige Substratkonzentration  $[M \text{ (nt)}]$  können die kinetischen Parameter durch Anpassung der erhaltenen Kurven an die Michaelis-Menten-Gleichung

$$v = k_{\text{cat}} \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

mit Hilfe des Computerprogramms MS Excel berechnet werden. Fehlergrenzen wurden mit dem Programm SigmaPlot® (Jandel Scientific) bestimmt.

### 2.6.2.2 Untersuchung der Salzabhängigkeit

Die Salzabhängigkeit ausgewählter Mutanten der *Serratia* Nuklease wurde mit Hilfe des Kunitz-Assays unter Messung des hyperchromen Effektes bestimmt (s. Kap. 2.6.2). Dazu wurden 0.05 mg/ml Heringsspermien-DNA in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei Raumtemperatur durch 2-200 nM (entsprechend 250 000 K.U./l) des jeweiligen Enzyms gespalten. Die Salzkonzentration wurde dabei von 0 bis 400 mM NaCl variiert.

### 2.6.2.3 Untersuchung der Metallionenabhängigkeit

Zur Untersuchung der Metallionenabhängigkeit der Wildtyp-Nuklease sowie bestimmter Enzymvarianten wurde unter Verwendung des Hyperchromizitäts-Assays (s. Kap. 2.6.2) der  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert für die Hydrolyse von hochmolekularer DNA in 50 mM Tris/HCl und 5 bzw. 1 mM verschiedener zwei- und dreiwertiger Metallionen bestimmt. Um ein Ausfallen von Metallhydroxiden bei hohen pH-Werten zu verhindern, wurde ein pH-Wert von 7.5 eingestellt. Als Substrat wurde Heringsspermien-DNA in Konzentrationen von 20 – 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die für diese Experimente verwendeten Enzymlösungen wurden gegen 1 mM EDTA, pH 8.0 und anschließend gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert, um Spuren von Metallionen zu entfernen. Ebenso wurde die verwendete DNA-Lösung zunächst gegen 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 sowie anschließend gegen 10 mM Tris/HCl, pH 8.0 dialysiert.

Die Metallionenabhängigkeit der Mutante N119H wurde, da die Messung im Photometer aufgrund des Ausfallens des Proteins gestört wurde, mit Hilfe der Spaltung überspiralisierter Plasmid-DNA (s.u.) durchgeführt, was den Vorteil bietet, daß geringere Enzymkonzentrationen eingesetzt werden können.

Bei der Untersuchung der Magnesiumionen-Konzentrationsabhängigkeit der Mutante N119D wurde im Hyperchromizitäts-Assay die Aktivität dieser Enzymvariante und zum Vergleich der Wildtyp-Nuklease bei  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 30 mM bestimmt. NaCl wurde jeweils in solchen Konzentrationen zugesetzt, daß insgesamt eine Ionenstärke von 0.1 M erreicht wurde. Die Reaktion erfolgte bei Raumtemperatur mit 0.075 mg/ml Heringsspermien-DNA in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0. Die Mutante wurde in 50 nM Konzentrationen eingesetzt, das Wildtyp-Enzym in 0.5 nM.

### 2.6.3 Spaltung kurzer Oligonukleotidsubstrate und Analyse mittels Homochromatographie

In dieser Arbeit wurden kurze DNA-Substrate verwendet, um den Einfluß von Aminosäureaustauschen innerhalb der *Serratia* Nuklease auf die Spaltung von Substraten verschiedener Länge zu untersuchen.

Die verwendeten Oligonukleotide  $d(\text{pA})_4$ ,  $d(\text{pA})_5$  und die Substrate der Reihe  $d(\text{A}_n\text{GCT}_n)$ ,  $n = 2$  bis 6, wurden radioaktiv markiert und in Spaltreaktionen eingesetzt, die in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  das jeweilige Substrat in einer Konzentration von 0.5  $\mu\text{M}$  enthielten. Die zu untersuchenden Enzyme wurden in Konzentrationen von 1 nM bis 1  $\mu\text{M}$  hinzugegeben. Alle Reaktionen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die qualitative und quantitative Analyse der Spaltprodukte erfolgte mittels Homochromatographie. Mit Hilfe dieser Technik, die eine Anionenaustauscher-Chromatographie darstellt, können Oligonukleotide verschiedener Länge voneinander getrennt werden, indem sie mit den in der mobilen Phase enthaltenen unterschiedlich langen RNA-Hydrolyseprodukten in Konkurrenz treten um Bindungsplätze an der positiv geladenen stationären Phase, einer Dünnschichtfolie aus Cellulose DEAE (Polygram<sup>®</sup> CEL300, Macherey-Nagel) (Brownlee & Sanger, 1969).

1  $\mu\text{l}$ -Aliquots der Spaltreaktionen werden nach definierten Reaktionszeiten auf die DEAE-Folie aufgetragen und die Reaktion damit gestoppt. Die chromatographische Auftrennung der

Oligonukleotide erfolgt anschließend bei 65 °C für ca. 2 h mit einem RNA-Hydrolysat (s.u.) als Laufmittel. Mit einem InstantImager™ (Canberra Packard) kann dann die qualitative und quantitative Auswertung erfolgen.

RNA-Hydrolysat (Laufmittel):      20 g Hefe-RNA  
   80 ml H<sub>2</sub>O  
   20 ml KOH  
   Inkubation für 48 h bei 37 °C  
   Neutralisation mit HCl  
   Zugabe von 420 g Harnstoff  
   Auffüllen auf 1 l

## 2.6.4 Spaltung von überspiralisierter Plasmid-DNA

Plasmidspaltungen wurden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um die Spalteigenschaften von Varianten der *Serratia* Nuklease zu charakterisieren sowie den Einfluß verschiedener Metallionen auf die Hydrolysereaktion zu untersuchen.

Als Substrat wurde das Plasmid pBSK<sup>+</sup> (2958 bp) in einer Konzentration von 0.02 µg/µl eingesetzt. Die Reaktionen wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub> mit Enzymkonzentrationen von 1 pM bis 200 pM (ca. 1000 K.U./l) bei Raumtemperatur durchgeführt. Zur Untersuchung der Metallionenabhängigkeit der Nuklease-Reaktion wurde 50 mM Tris/HCl, pH 7.4 als Reaktionspuffer verwendet, um ein Ausfallen der Metalle zu verhindern, die in Konzentrationen von 1 bzw. 5 mM eingesetzt wurden.

Nach definierten Zeitabständen wurden 10 µl-Aliqots aus einem Reaktionsansatz von insgesamt 100 µl entnommen und in 6 µl Agarose-Auftragspuffer mit 50 mM EDTA gegeben, wodurch die Reaktion gestoppt wurde. Die anschließende Analyse erfolgte über Agarosegelelektrophorese.

Mit diesem Assay wurde auch die Aktivität der Nuklease-Variante N119H in Abhängigkeit von verschiedenen Metallionen bestimmt. Dazu wurde 0.02 µg/µl pBSK<sup>+</sup> mit 5 mM der entsprechenden Metallsalzlösung in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 bei RT mit 7.5 nM des Enzyms inkubiert und die Spaltprodukte wie oben beschrieben analysiert. Dabei trat das oben beschriebene Problem des Ausfallens des Enzyms nicht auf.

### 2.6.5 Spaltung abasischer Oligonukleotide

Die folgenden Oligodesoxyribonukleotide mit jeweils einer abasischen *site* (gekennzeichnet durch einen Unterstrich) wurden verwendet, um mögliche Kontakte bestimmter aromatischer Aminosäuren zu den Basen eines Substrates zu untersuchen:

d (A\_ AAA)  
d (AA\_ AA)  
d (AAAAA\_ CTTTTT)  
d (AAAAAG\_ TTTTT)

Zum Vergleich wurde auch die Spaltung des unmodifizierten Pentanukleotids d(pA)<sub>5</sub> sowie des Dodekamers d(A<sub>5</sub>GCT<sub>5</sub>) untersucht. Diese Oligonukleotide wurden mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP radioaktiv markiert (Kap. 2.3.3.3) und in einem 20  $\mu$ l-Ansatz 0.5  $\mu$ M Substrat in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei geeigneten Konzentrationen des Wildtyp-Enzyms sowie der Mutanten Y76A, W123A und K48A bei Raumtemperatur inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden Aliquots entnommen und die Reaktionsprodukte mittels Homochromatographie (s. Kap. 2.6.3) aufgetrennt. Aus der Kinetik des Substratabbaus wurden schließlich apparente Reaktionsgeschwindigkeiten berechnet.

## 2.7 Spaltung des artifiziellen Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat

In dieser Arbeit wurde die Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn) als neues artifizielles Minimalsubstrat der *Serratia* Nuklease etabliert und die Spaltung durch unterschiedliche Enzymvarianten untersucht.

### 2.7.1 Spaltung durch die Wildtyp-Nuklease

Zunächst wurde in dieser Arbeit die Spaltposition der *Serratia* Nuklease innerhalb des Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn) bestimmt.

Dazu wurde zunächst während einer Hydrolysereaktion die Änderung der Absorption bei 330 nm ( $\lambda_{\max}$  von *p*-Nitrophenylphosphat,  $\epsilon_{330} = 4260 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Liao, 1975) bzw. 400 nm ( $\lambda_{\max}$  von *p*-Nitrophenol,  $\epsilon_{400} = 17\,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Liao, 1975) in Küvetten von 1 bzw. 0.1 cm Schichtdicke in einem Hitachi U-3000 Spektrophotometer beobachtet. Das Substrat wurde dabei in einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  mit 5  $\mu\text{M}$  *Serratia* Nuklease in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei RT umgesetzt. Die Konzentrationsbestimmung von npdTpn erfolgte mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten von  $\epsilon_{275 \text{ nm}} = 22\,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Um zu untersuchen, ob die Freisetzung von *p*-Nitrophenol an der 5' - oder 3' -Seite erfolgt, wurden die Hydrolyseprodukte einer Reaktion, bei der insgesamt 1 mM npdTpn und 5  $\mu\text{M}$  *Serratia* Nuklease eingesetzt worden waren, einer Behandlung mit 0.01 U Shrimps Alkalischer Phosphatase unter Zugabe des dazugehörigen 10x-Phosphatase-Puffers unterzogen. Anschließend wurde das Produkt nach den Angaben des Herstellers mit  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  und Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert und über Homochromatographie analysiert (Kap. 2.6.3). Zum Vergleich wurden die Hydrolyseprodukte einer Reaktion mit 1 mM npdTpn und 2  $\mu\text{M}$  DNase I der gleichen Behandlung unterzogen.

### 2.7.2 Kinetische Untersuchungen an Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat

Die Bestimmung des  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wertes der durch die *Serratia* Nuklease und verschiedene Varianten katalysierten Hydrolysereaktion erfolgte durch die Aufzeichnung des Anstiegs der Absorption bei 400 nm im *Time scan*-Modus eines U-3000 Spektrophotometers (Hitachi). Das Substrat npdTpn wurde dabei in Konzentrationen von 0.1 bis 34 mM eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei Raumtemperatur in Küvetten von 1 cm bzw. bei hohen Substratkonzentrationen von 0.1 cm Schichtdicke. Die jeweiligen Anfangsgeschwindigkeiten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen, wobei die Steigung der erhaltenen Kurve im Anfangsbereich den  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert ergibt.

## 2.8 Proteinstrukturdaten und 3-D-Modellierung

Daten der dreidimensionalen Struktur der *Serratia* Nuklease (PDB-Einträge: 1SMN, 1QAE) sowie der *Homing*-Endonuklease I-*PpoI* (PDB-Einträge: 1A73, 1A74, 1IPP) wurden der *Protein Data Bank*, Brookhaven, entnommen (<http://www.rcsb.org/pdb/>).

Die Modellierung von DNA in das aktive Zentrum der *Serratia* Nuklease erfolgte mit Hilfe des Programms *Swiss Model* durch Übereinanderlagerung der Aminosäuren 84-92 und 107-119 (1SMN) mit der Region des aktiven Zentrums von I-*PpoI* (Aminosäuren 93-101 und 107-119 aus 1A74) und Übernahme der Koordinaten der Nukleinsäure aus den Strukturdaten der *Homing*-Endonuklease.

## 3 ERGEBNISSE

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ergänzend zu vorhergehenden Studien über die unspezifische Nuklease aus *Serratia marcescens*, weitere Untersuchungen zur Katalyse durchzuführen und dabei insbesondere die Bindung von Substraten an dieses Enzym näher zu charakterisieren. Der methodische Ansatz bestand im Austausch einzelner Aminosäurereste durch *in vitro*-Mutagenese und anschließende Analyse der Bindungs- und Spalteigenschaften der so generierten Varianten.

### 3.1 Produktion rekombinanter Varianten der *Serratia* Nuklease

Neben der Wildtypform der *Serratia* Nuklease wurden verschiedene Mutanten, die im Folgenden beschrieben werden, als rekombinante Proteine generiert und aus *E. coli* aufgereinigt ( Kap. 2.4): Zur weiterführenden Aufklärung des Katalysemechanismus wurden die schon in früheren Arbeiten (Friedhoff 1995, Friedhoff *et al.*, 1996b) als essentiell erkannten Aminosäuren His89, Asn119 und Glu127 untersucht, indem die Mutanten H89A, N119A, N119D, N119H, N119Q sowie die Variante E127A in unterschiedlichen Experimenten eingesetzt wurden.

Für die Ermittlung von Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, wurden neben den Positionen Arg57, Arg87 und Arg131, die schon früher untersucht worden waren (Friedhoff 1995, Friedhoff *et al.*, 1996b), die basischen Aminosäurereste Lys48, Lys55, Lys60, Lys84, Arg125, Lys132, Arg136 und Lys196 einbezogen. Diese Positionen wurden ausgewählt, da sie, wie aus der Kristallstruktur ersichtlich, eine Grube flankieren, die die vermutliche Nukleinsäure-Bindungsregion der *Serratia* Nuklease darstellt (Miller *et al.*, 1994). Weiterhin liegen einige dieser Aminosäuren in der Familie der unspezifischen Nukleasen des *Serratia* Nuklease-Typs konserviert vor (s. Kap. 4.3.2.2). Um den Einfluß der positiven Ladung dieser Aminosäuren auf die Bindungseigenschaften der Nuklease zu untersuchen, wurden sie gegen Alanin ausgetauscht. Dadurch wurde die Ladung entfernt, ohne dabei eine große Seitenkette einzuführen, die zu sterischen Behinderungen führen könnte.

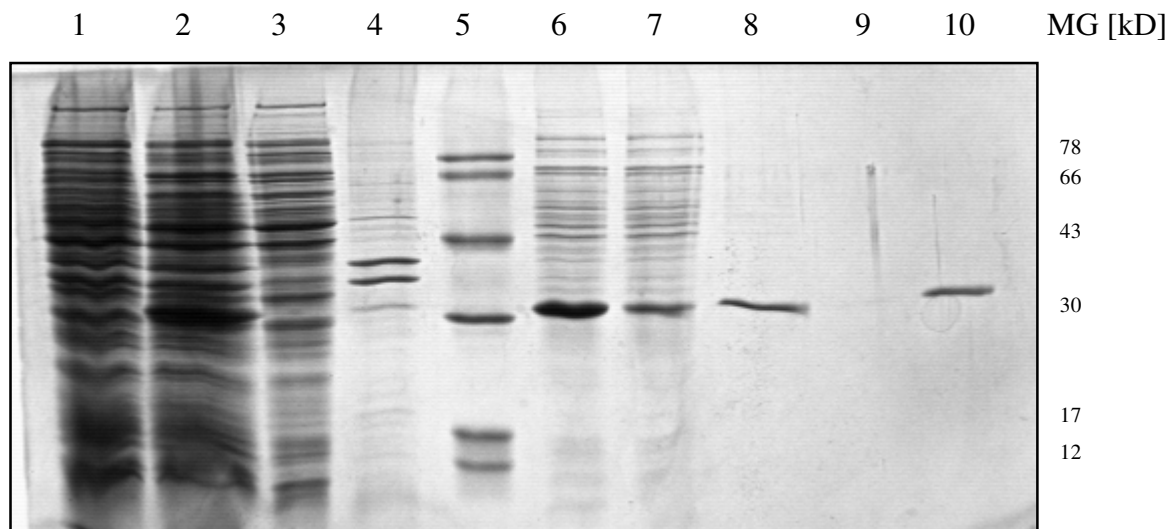


Weiterhin sollte die Funktion der aromatischen Aminosäurereste Tyr76 und Trp123 bei der Substratbindung näher charakterisiert werden, nachdem in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, daß die aromatischen Ringe dieser Aminosäuren entweder in struktureller Hinsicht oder für die Bindung eines Substrates eine Bedeutung haben müssen (Meiss *et al.*, 1999, 2000). Hierzu wurden wiederum die Alanin-Mutanten dieser Aminosäuren untersucht.

### 3.1.1 Aufreinigung der Nuklease-Varianten

Die Mutanten R57A, R57K, R87A, R87K, H89A, N119A, N119D, N119H, N119Q, E127A sowie R131A wurden von Dr. Friedhoff und Dr. Gimadutdinow generiert (Friedhoff, 1995); Plasmidpräparationen der Mutanten Y76A und W123A stammten von Dr. Meiß (Meiß, 1997). Die genannten Nuklease-Varianten mußten daher lediglich aus einer Expressionskultur von *E. coli* TGE900-Zellen aufgereinigt werden (s.u.). Die Gene der übrigen charakterisierten Varianten der Nuklease wurden, ausgehend von dem Wildtyp-Plasmid pHisNuc, mit Hilfe der 2-PCR-Methode hergestellt (s. Kap. 2.4.1). Die Sequenzen der hierzu verwendeten Mutageneseprimer sowie die Nukleinsäure- und Proteinsequenz der *Serratia*-Nuklease sind im Anhang aufgeführt (Kap. 7.1 und 7.2). Durch eine vollständige Sequenzierung des Nukleasegens wurde die erfolgreiche *in vitro*-Mutagenese sowie die Abwesenheit von Sekundärmutationen überprüft.

Alle Mutanten wie auch das Wildtyp-Enzym ließen sich gut in *E. coli* TGE900-Zellen überexprimieren und aufgrund ihres His-tags über Affinitätschromatographie aufreinigen. Beispielhaft ist in **Abb. 3-1** für die Mutante K48A die Trennung von Fraktionen der einzelnen Aufreinigungsschritte durch SDS-PAGE gezeigt. Nach der Induktion durch Temperaturerhöhung und die dadurch bedingte Inaktivierung des  $\lambda$ -Repressors erfolgt eine deutliche Expression des Nuklease-Gens, das in diesen Zellen unter der Kontrolle des  $\lambda P_L$ -Promotors steht. Das Protein, das in *E. coli* in sog. *inclusion bodies* vorliegt, konnte nach dem Zellaufschluß durch Ultraschall mittels Harnstoffbehandlung aus diesen solubilisiert und anschließend über eine Nickel-NTA-Säule weiter aufgereinigt werden. Aus der Abbildung wird ersichtlich, daß die übrigen Zellproteine nahezu vollständig die Säule passieren, sich jedoch auch noch Nuklease im Durchlauf befindet, weshalb dieser wiederholt auf die Säule gegeben wurde. Proteinverluste ergaben sich durch das anschließende Waschen der Säule mit Puffer. Nach der Elution weist das Enzym eine Reinheit von >95 % auf. Aus einem Volumen von 500 ml Bakterienkultur ließen sich auf diese Weise bis zu 4 mg Enzym gewinnen.

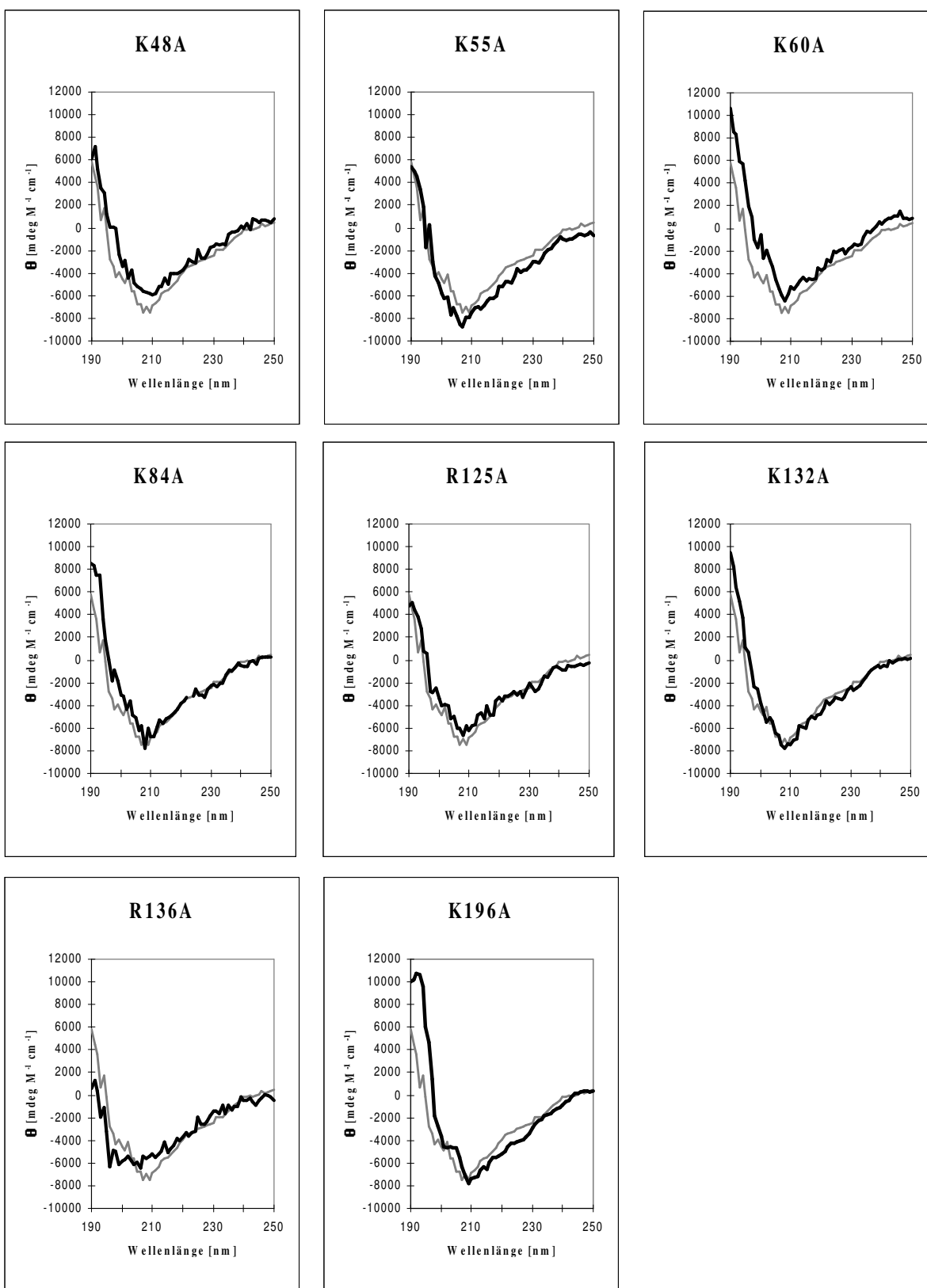


**Abb. 3-1:** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse der während der Aufreinigung der Nuklease-Mutante K48A erhaltenen Fraktionen. Färbung der Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue.

1: Zellysat vor Induktion, 2: Zellysat nach Induktion, 3: Überstand nach Zellaufschluß und Zentrifugation, 4: Pellet nach Harnstoffbehandlung, 5: Proteinstandard IV (Merck), das Molekulargewicht der Komponenten ist rechts angegeben, 6: Proteinlösung vor Auftrag auf die Säule, 7: 1. Durchlauf der Affinitätssäule, 8: Waschlösung, 9: Säulenmaterial, 10: Eluat der Affinitätssäule.

### 3.1.2 CD-Spektroskopie zur Charakterisierung neu generierter Enzymvarianten

Um Aufschluß über eine eventuell veränderte dreidimensionale Struktur der erzeugten Nuklease-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym zu erhalten, wurden von den generierten Alanin-Mutanten CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 190 – 250 nm aufgenommen (**Abb. 3-2**). Bis auf die Mutante R136A zeigen alle erzeugten Enzymvarianten ein dem Wildtyp entsprechendes CD-Spektrum, woraus man auf eine vergleichbare Sekundärstrukturzusammensetzung schließen kann. Die eingefügten Aminosäureaustausche haben deshalb wahrscheinlich keinen größeren Effekt auf die dreidimensionale Struktur des Proteins. Der Austausch des Arginin an der Position 136 gegen ein Alanin jedoch scheint eine gewisse Störung der Sekundärstruktur zu bewirken, was sich in einer leichten Verschiebung des CD-Spektrums äußert.



**Abb. 3-2:** CD-Spektren neu generierter Nuklease-Varianten. Zum Vergleich ist jeweils das Spektrum des Wildtyp-Enzyms (hellgrau) dargestellt. Je 5  $\mu\text{M}$  Proteinlösung wurden in 10 mM Tris/HCl, pH 8.2 in Zylinderküvetten von 0.05 cm Schichtdicke untersucht (s. Kap. 2.5.2).

## 3.2 Kinetische Untersuchungen an Mutanten der Aminosäure Asparagin 119

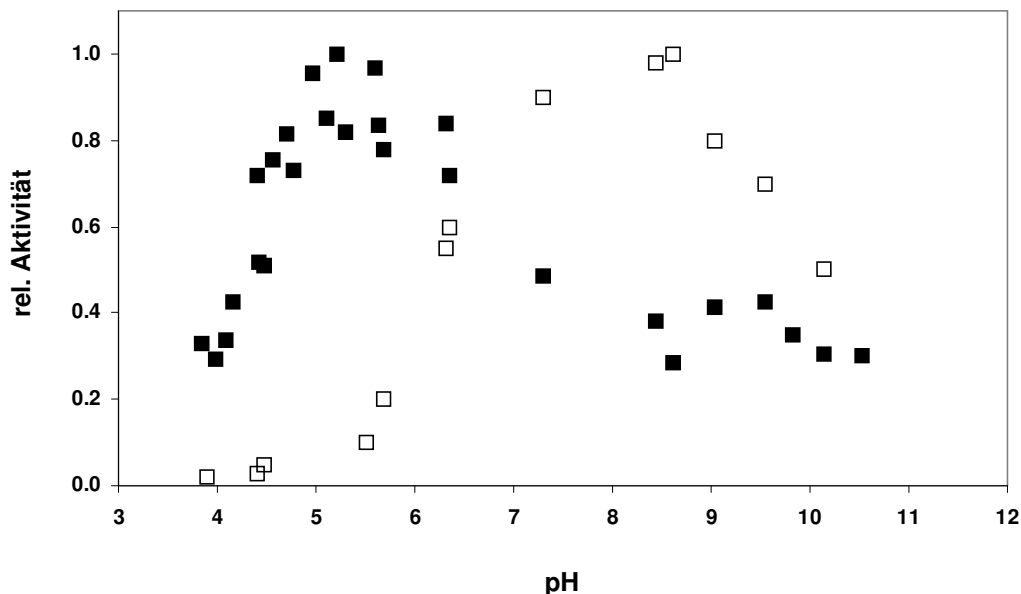
Erst in jüngster Zeit konnte die genaue Struktur der  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle der *Serratia* Nuklease im Detail aufgeklärt werden, wobei gezeigt wurde, daß das Asparagin 119 über seine Amidgruppe als einziger Proteinligand direkt an der Metallionen-Koordinierung beteiligt ist (Miller *et al.*, 1999). Doch schon vorher wurde mit Hilfe von Mutagenese- und kinetischen Experimenten versucht, die an der Koordinierung möglicherweise beteiligten Aminosäurereste zu charakterisieren (Friedhoff *et al.*, 1994b, 1996; Friedhoff 1995). Die im Folgenden beschriebenen kinetischen Untersuchungen einiger Nuklease-Varianten mit Mutationen an der Position 119 schließen sich an frühere Studien an und lieferten schon vor der Aufklärung der tatsächlichen Struktur deutliche Hinweise auf eine für Proteine ungewöhnliche Beteiligung einer Amidgruppe an der Metall-Koordinierung.

### 3.2.1 pH-Profil der Mutante N119D

Nach der Aufreinigung der Nuklease-Variante N119D aus einer *E. coli*-Expressionskultur wurde das pH-Profil der Mutante und zum Vergleich auch das des Wildtyps mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Aktivitätsassays unter Verwendung hochmolekularer DNA und unterschiedlicher Puffersysteme erstellt (Kap. 2.6.1.1).

Dabei gibt es eine deutliche Abweichung des pH-Profiles der Mutante N119D von dem der Wildtyp-Nuklease (**Abb. 3-3**): Während die Wildtyp-Form der *Serratia* Nuklease bei etwa pH 8.5 sein Aktivitätsoptimum besitzt (Friedhoff *et al.*, 1996b,c), ist das pH-Optimum der Mutante stark zu niedrigeren pH-Werten verschoben. Nach einem Aktivitätsmaximum bei pH 5 fällt die Aktivität im neutralen und alkalischen Bereich um etwa 60 % ab.

Das Einfügen eines Aspartats an der Position 119 scheint also nur in einem engen pH-Bereich toleriert zu werden; auffällig ist, daß eine negative Ladung an dieser Stelle zu einer starken Reduktion der Nuklease-Aktivität führt. Dieses Ergebnis wird in Kap. 4.2.1 im Zusammenhang mit der Struktur der Magnesium-Bindungsstelle ausführlicher diskutiert.



**Abb. 3-3:** pH-Profil der Mutante N119D (■) sowie der Wildtyp-Nuklease (□). Die Aktivitäten sind relativ zu der jeweils höchsten des entsprechenden Enzyms angegeben und wurden mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Aktivitätsassays bestimmt.

### 3.2.2 Metallionenabhängigkeit von Enzymvarianten mit Mutationen an der Position 119

Zusätzlich zu der schon früher untersuchten Metallionenabhängigkeit der Mutante N119D (Friedhoff, 1995) wurde die Aktivität der Nuklease-Varianten N119Q und N119H beim Einsatz verschiedener Metallionen als Cofaktoren untersucht (**Tab. 3-1**).

Im Vergleich zum Wildtyp der *Serratia* Nuklease, der die höchste Aktivität mit Magnesium aufweist, welches nur bedingt durch Mangan ersetzt werden kann, zeigen die Varianten mit Aminosäureaustauschen an der Position 119 eine deutlich relaxierte Abhängigkeit von der Art des Metallions. Am deutlichsten ausgeprägt ist dieser Effekt bei der Mutante N119D (Friedhoff, 1995), die mit  $\text{Zn}^{2+}$  sogar 40 mal aktiver ist als mit  $\text{Mg}^{2+}$ . Doch auch die Aktivität der Variante N119Q ist mit den übrigen getesteten Metallionen größer als mit dem eigentlichen Cofaktor des Enzyms. Der Austausch des Asparagin gegen ein Histidin führt dagegen zu einem Enzym mit vergleichbar reduzierter Aktivität mit  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  relativ zu  $\text{Mg}^{2+}$  wie sie auch der Wildtyp aufweist. Dagegen kann die Mutante durch  $\text{Ni}^{2+}$  teilweise aktiviert werden und zeigt mit diesem

Metallion einen um den Faktor 3 – 4 geringeren Aktivitätsverlust relativ zu  $\text{Mg}^{2+}$  als das Wildtyp-Enzym. Mit  $\text{Zn}^{2+}$  und  $\text{Cd}^{2+}$  ist die Aktivität ähnlich wie beim Wildtyp so weit reduziert, daß keine DNA-Spaltung mehr detektiert werden kann.

**Tab. 3-1:** Aktivität von Varianten der *Serratia* Nuklease unter dem Einfluß verschiedener Metallionen. Für  $\text{Mg}^{2+}$  sind die  $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte angegeben; die Werte für die anderen Metallionen sind relative Daten und beziehen sich jeweils auf die Aktivität mit  $\text{Mg}^{2+}$ .

Enzym	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Co}^{2+}$	$\text{Ni}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Cd}^{2+}$
	$[\text{sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}(\text{nt})]$	rel.	rel.	rel.	rel.	rel.
wt	16	0.85	0.5	0.078	0.02	0.03
N119Q	$5.6 \times 10^{-3}$	2.2	n.b.	7.5	5.2	6.9
N119D <sup>a</sup>	$5.0 \times 10^{-4}$	1.9	23	10	39	4
N119H <sup>b</sup>	$1.0 \times 10^{-5}$	0.81	0.64	0.3	–	–

n.b. nicht bestimmt

<sup>a</sup> Daten aus Friedhoff, 1995. Bei der Mutante N119D wurden die Metallionen zu 1 mM sowie als Substrat das Dodekamer  $\text{d}(\text{A}_5\text{GCT}_5)$  eingesetzt. Der pH-Wert betrug 8.0.

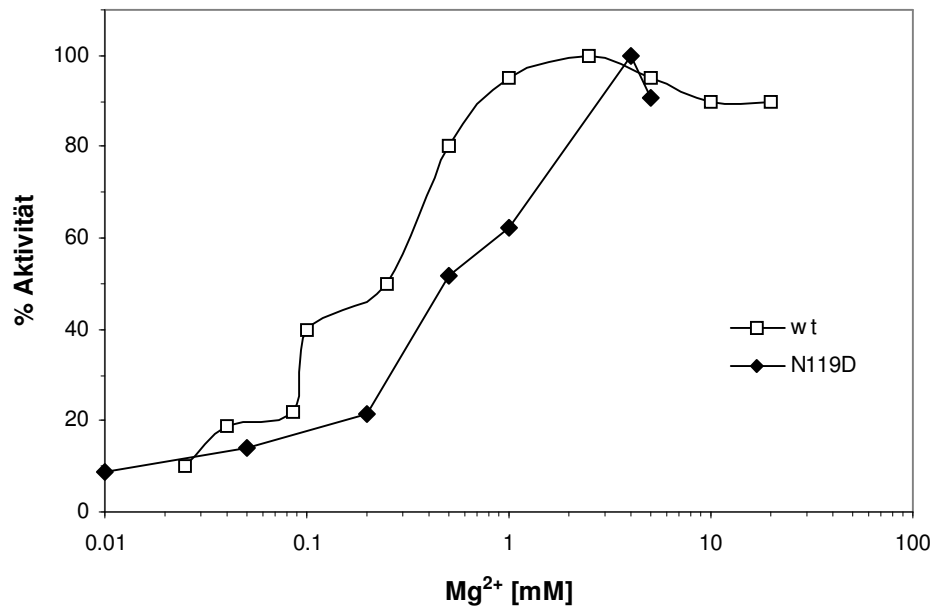
<sup>b</sup> Die Werte für N119H wurden im Plasmid-Spaltassay mit  $0.02 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  pBSK<sup>+</sup> und je 5 mM des Metalls in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5 bei RT gemessen.

Die übrigen Daten wurden mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays mit hochmolekularer DNA als Substrat und 5 mM des jeweiligen Metallions bei pH 7.5 gewonnen.

Dieses Ergebnis ist besonders interessant bezüglich der jüngst entdeckten strukturellen Ähnlichkeit der aktiven Zentren der *Serratia* Nuklease und der Colicin E9 DNase (Kühlmann *et al.*, 1999) (s. Kap. 1.2.3). Bei dieser Nuklease befindet sich an der dem Asparagin 119 der *Serratia* Nuklease entsprechenden Position ein Histidin-Rest, der an der Koordinierung eines als Cofaktor dienenden  $\text{Ni}^{2+}$ - bzw.  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions beteiligt ist. Diese Situation kann also mit der Mutante N119H nachgebildet werden, die tatsächlich mit  $\text{Ni}^{2+}$  eine relativ höhere Aktivität aufweist als der Wildtyp der *Serratia* Nuklease mit diesem Metallion.

Betrachtet man die Aktivität der Wildtyp-Nuklease sowie der Mutante N119D bei unterschiedlichen  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen (Abb. 3-4), so ist die Aktivität der Mutante um den Faktor 2 bis 3 zu höheren  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen hin verschoben. Ähnliche Kurvenverläufe zeigten auch die Nuklease-Varianten D86A und E127A (Friedhoff *et al.*, 1996b), was mit einer

im Vergleich zu der Wildtyp-Nuklease leicht reduzierten Affinität der Mutanten für den Cofaktor erklärt wurde.



**Abb. 3-4:** Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationsabhängigkeit der DNA-Spaltung durch die Nuklease-Variante N119D im Vergleich zum Wildtyp-Enzym im Hyperchromizitäts-Assay. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die jeweils maximale Aktivität des untersuchten Enzyms.

Alle untersuchten Varianten der *Serratia* Nuklease mit Aminosäureaustauschen an der Position 119 zeigen also eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Abhängigkeit ihrer Aktivität von unterschiedlichen Metallionen. Dies verdeutlicht die Bedeutung des Asparagin 119 für die Metallbindung und wird durch die neueren Strukturdaten bestätigt, die diesen Aminosäurerest als alleinigen direkten Proteinliganden bei der Koordinierung des Cofaktors ausweisen.

### 3.3 Spaltung des Minimalsubstrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat

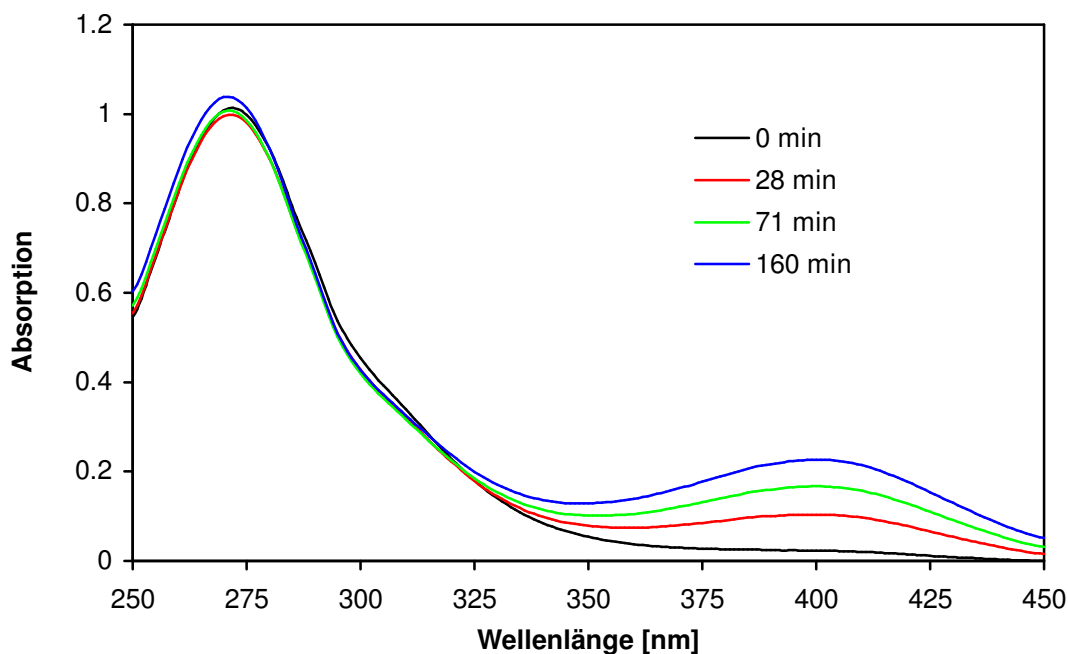
Lange Zeit wurde in der Literatur ein Pentanukleotid als das Minimalsubstrat für die *Serratia* Nuklease und (Mono-), Di-, Tri- und Tetranukleotide als die Endprodukte einer Spaltung von hochmolekularer DNA beschrieben (Nestle & Roberts, 1969b), bis Friedhoff *et al.* (1996a) in systematischen Untersuchungen zeigten, daß auch ein Tetranukleotid gespalten werden kann, wenn auch mit stark reduzierter Geschwindigkeit. Dabei stellte sich der in 3'-Richtung von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung befindliche Phosphatrest als der wichtigste heraus: Fehlt er, so findet keine oder nur minimale Spaltung statt.

In dieser Arbeit wurde erneut der Frage nach dem Minimalsubstrat der *Serratia* Nuklease nachgegangen und untersucht, ob und in welchem Ausmaß die Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn; s. **Abb. 3-7**) als Substrat akzeptiert und umgesetzt wird. Dieses synthetisch hergestellte Substrat wird auch von anderen unspezifischen Nukleasen wie der aus *Staphylococcus aureus* (Cuatrecasas *et al.*, 1969) sowie von der DNase I (Liao, 1975) hydrolysiert.

#### 3.3.1 Bestimmung der Spaltposition der *Serratia* Nuklease im Substrat Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat

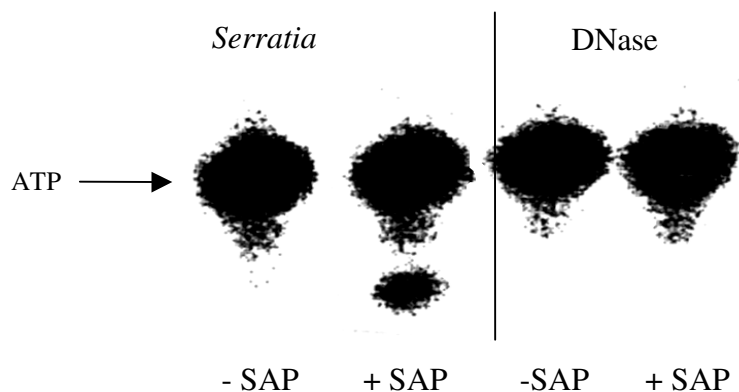
Die Hydrolyse des Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphates konnte, wenn auch lediglich unter hohen Substrat- und Enzymkonzentrationen, im Photometer durchgeführt und verfolgt werden, wobei ein Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm beobachtet wird (**Abb. 3-5**). Dies zeigt, daß *p*-Nitrophenol gebildet wird, welches lediglich in seiner ionischen und unprotonierten Form bei 400 nm eine Absorption zeigt ( $\epsilon_{400} = 17\,200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; Liao, 1975), was auch optisch anhand einer Gelbfärbung der Lösung erkennbar ist. Dagegen tritt bei einer Wellenlänge von 330 nm keine signifikante Änderung der Absorption auf, die für die Entstehung von *p*-Nitrophenylphosphat ( $\epsilon_{330} = 4260\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ; Liao, 1975) charakteristisch wäre. Die ebenfalls synthetische Substanz Desoxythymidin-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat wird von der *Serratia* Nuklease dagegen nicht gespalten.





**Abb. 3-5:** Änderung der Absorption bei 250 bis 450 nm Wellenlänge über einen Zeitraum von 160 min, hervorgerufen durch die Spaltung von 35  $\mu$ M Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch 5  $\mu$ M *Serratia* Nuklease.

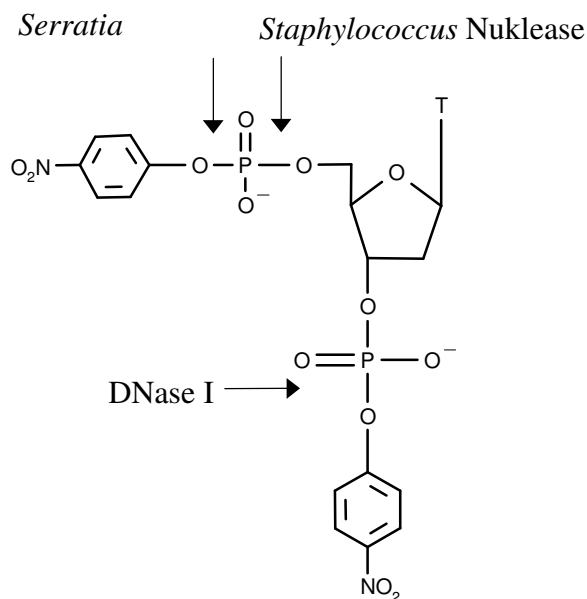
Um zu überprüfen, ob die Freisetzung von *p*-Nitrophenol an der 5' - oder 3' -Seite erfolgt, wurde das Hydrolyseprodukt zunächst mit Alkalischer Phosphatase inkubiert, um es anschließend mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP und Polynukleotid-Kinase radioaktiv zu markieren. Beide Enzyme sind spezifisch für das 5' -Ende von Nukleinsäuren. Zum Vergleich wurden die Hydrolyseprodukte einer Reaktion von npdTpn mit DNase I der gleichen Behandlung unterzogen. Von dieser Nuklease ist bekannt, daß sie, im Gegensatz zur Spaltung von DNA, wo Produkte mit 5' -Phosphaten entstehen, dieses künstliche Substrat an der 3' -Seite hydrolysieren, wobei *p*-Nitrophenol und Desoxythymidin-5' -(*p*-nitrophenyl)-phosphat entstehen (Liao, 1975). Wie aus **Abb. 3-6** ersichtlich, entsteht nur bei der *Serratia*-Reaktion und lediglich nach vorheriger Behandlung mit Alkalischer Phosphatase ein radioaktiv markierbares Produkt.



**Abb. 3-6:** Homochromatogramm der radioaktiv markierten Produkte der Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch die *Serratia* Nuklease (links) bzw. DNase I (rechts). Die Phosphorylierung mit [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP und Polynukleotid-Kinase erfolgte jeweils vor bzw. nach vorheriger Behandlung mit Shrimps Alkalischer Phosphatase (SAP).  
Nur bei der Reaktion mit der Nuklease aus *Serratia marcescens* und lediglich nach vorangegangener Phosphatase-Behandlung entsteht ein radioaktiv markierbares Produkt.

Dies bedeutet, daß im Gegensatz zu DNase I die Spaltung durch die *Serratia* Nuklease an der 5' - Seite des Substrates erfolgt, wobei *p*-Nitrophenol sowie Desoxythymidin-3'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat entsteht (**Abb. 3-7**).

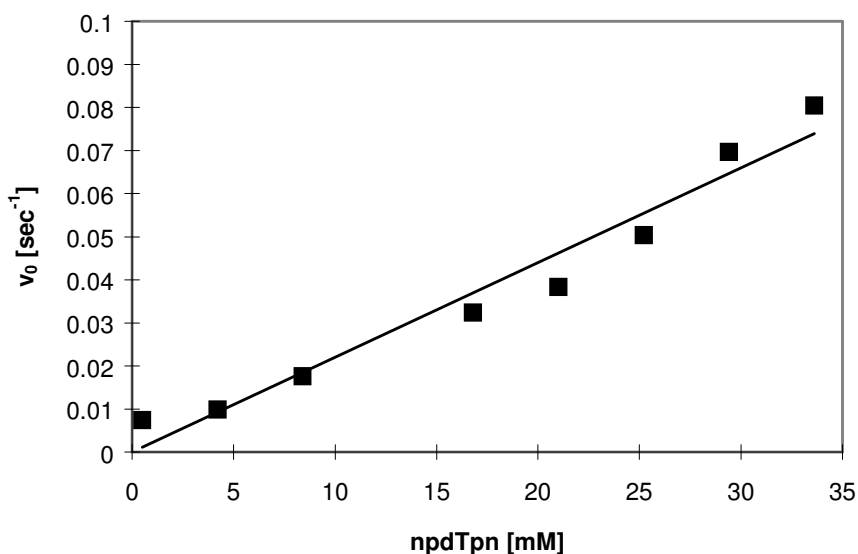
**Abb. 3-7:** Struktur des artifiziiellen Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat mit den Spaltstellen für die *Serratia* Nuklease, DNase I (Liao, 1975) und für die Nuklease aus *Staphylococcus aureus* (Cuatrecasas *et al.*, 1969).



Letzteres kann nach Abspaltung des 5'-Phosphates durch Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert werden. Eine zusätzliche Spaltung an der 3'-Seite scheint nicht aufzutreten, da nach vollständiger Hydrolyse von npdTpn durch die *Serratia* Nuklease nach Zugabe von DNase I ein weiterer Anstieg der Absorption bei 400 nm beobachtet werden kann (Daten nicht gezeigt), was auf die Freisetzung von 3'-*p*-Nitrophenol durch DNase I zurückzuführen ist.

### 3.3.2 Kinetische Untersuchungen an Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch die *Serratia* Nuklease wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen aus dem Anstieg der Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm bestimmt (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8:**  $v_0/[S]$ -Diagramm der Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch die *Serratia* Nuklease. Die Anfangssteigungen  $v_0$  wurden aus der Messung der Absorptionssteigerung bei 400 nm bei verschiedenen Substratkonzentrationen in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  bei RT bestimmt.

Dabei konnte selbst mit den höchsten einsetzbaren Substratkonzentrationen keine Substratsättigung erreicht werden, so daß aus der Steigung der Geraden lediglich der  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert der Reaktion bestimmt werden konnte, der mit  $2 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  um den Faktor  $10^6$  kleiner ist als der für die Reaktion mit hochmolekularer DNA ( $16 \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}(\text{nt})$ ).

Verschiedene Enzymvarianten der *Serratia* Nuklease wurden eingesetzt, um deren Aktivität gegenüber dem artifiziellen Minimalsubstrat Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3-2** zusammengefaßt.

**Tab. 3-2:** Relative  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Werte für die Spaltung hochmolekularer DNA und des Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch die Wildtyp-Nuklease sowie einiger Mutanten. Die Daten für DNA wurden mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays bestimmt, die für npdTpn durch die Messung der Absorptionszunahme bei 400 nm aufgrund der Freisetzung von *p*-Nitrophenol.

Enzym	rel. $k_{\text{cat}}/K_M$ (DNA) <sup>a</sup>	rel. $k_{\text{cat}}/K_M$ (npdTpn) <sup>b</sup>
Wildtyp	1	1
R57A	0.006	2.5
R57K	0.06	1
R87A	0.003	1.5
R87K	0.5	2
H89A	$< 10^{-5}$	–
N119A	$< 10^{-5}$	–
N119Q	0.001	0.15
E127A	0.001	1
R131A	0.007	4

<sup>a</sup> Daten z.T. aus Friedhoff *et al.*, 1996b. Der Wert für den Wildtyp beträgt  $16 \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}(\text{nt})$ .

<sup>b</sup> Für die Wildtyp-Nuklease beträgt der  $k_{\text{cat}}/K_M$ -Wert für die Spaltung von npdTpn  $2 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ .

Es wird deutlich, daß der Großteil der untersuchten Nuklease-Mutanten das künstliche Substrat mit Wildtyp-Aktivität umsetzt. Lediglich Varianten der Aminosäuren His89 und Asn119, die aufgrund ihrer Funktion als allgemeine Base bzw. bei der direkten Koordination des Metallionen-Cofaktors essentiell für die katalytische Aktivität der *Serratia* Nuklease sind, zeigen keine meßbare oder eine nur langsame Spaltung.

Die Daten der Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat durch zusätzliche Varianten der *Serratia* Nuklease sind weiter unten in **Tab. 3-4** aufgeführt, doch auch hier zeigt sich, daß sich Mutationen von Aminosäureresten, die nicht direkt das aktive Zentrum des Enzyms betreffen, auf die Spaltung dieses artifiziellen Minimalsubstrates nicht auswirken.

### 3.4 Charakterisierung der Substratbindungsstelle der *Serratia* Nuklease

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Lage der Substratbindungsstelle der unspezifischen Nuklease aus *Serratia marcescens* und die beteiligten Aminosäuren zu bestimmen. Vordringlich zu untersuchende Aminosäuren sind dabei naturgemäß basische Reste wie Arginine und Lysine, die durch ihre positive Ladung prädestiniert sind, negativ geladene Nukleinsäuren anzuziehen und so eine korrekte Positionierung eines Substrates zu erreichen, wie auch aromatische Aminosäurereste, die durch *stacking*-Interaktionen mit den Basen einer Nukleinsäure ebenfalls zu einer effektiven Bindung beitragen können.

Es wurden insgesamt elf basische Aminosäuren ausgewählt, die nach den vorhandenen Strukturdaten eine längliche Grube flankieren, welche als die vermutliche Substratbindungsstelle der *Serratia* Nuklease angesehen wird (Miller *et al.*, 1994). Neben den schon vorhandenen und teilweise charakterisierten Mutanten R57A, R87A und R131A (Friedhoff, 1995; Friedhoff *et al.*, 1996b) wurden auch die übrigen Arginine und Lysine gegen Alanin ausgetauscht und die entstandenen Enzymvarianten funktionell untersucht, indem ihre nukleolytische Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten bestimmt und mit den Wildtyp-Daten verglichen wurde.

#### 3.4.1 Charakterisierung der nukleolytischen Aktivität der Bindungsmutanten

Durch den Austausch der insgesamt elf basischen Aminosäuren, die die vermutliche Substratbindungsstelle flankieren, durch Alanin und die anschließende funktionelle Charakterisierung der entstandenen Mutanten sollte die Beteiligung der jeweiligen Arginin- und

Lysinreste an der Substratbindung bestimmt werden. Da bei einer unspezifischen Nuklease eine direkte Messung der Bindungsstärke aufgrund der immer gleichzeitig stattfindenden Spaltung nur in sehr eingeschränktem Maße für völlig inaktive Mutanten bzw. bei Verwendung künstlicher Substrate möglich ist (Friedhoff *et al.*, 1994b, Kolmes, 1995), können Aussagen über die Beteiligung von Aminosäuren an der Substratbindung stattdessen über die Bestimmung der kinetischen Konstante  $K_M$  der jeweiligen Alaninmutanten gemacht werden, da diese unter Michaelis-Menten-Bedingungen ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat ist (Fersht, 1985).

#### 3.4.1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter $k_{cat}$ und $K_M$

Mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays (Kap. 2.6.2) wurden für die zu untersuchenden Bindungsmutanten der *Serratia* Nuklease die kinetischen Parameter  $k_{cat}$ ,  $K_M$  und  $k_{cat}/K_M$  aus dem Michaelis-Menten-Diagramm, das für jede neu generierte Variante im Anhang (Kap. 7.3) wiedergegeben ist, bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Tab. 3-3** aufgeführt.

Die Daten der Nuklease-Varianten R57A, R87A und R131A stammen aus früheren Arbeiten (Friedhoff *et al.*, 1996b) und weisen zugleich die größten Abweichungen von den Wildtyp-Parametern auf: Diese Mutanten besitzen auf hochmolekulare DNA bezogen eine gegenüber dem Wildtyp um mehr als 100fach verringerte Aktivität, was sich bei der Variante R57A vornehmlich in einem stark reduzierten  $k_{cat}$ -Wert widerspiegelt, während die Mutanten R87A und R131A mit einem 111- bzw. 35fach erhöhten  $K_M$ -Wert relativ zum Wildtyp-Enzym die größten beobachteten  $K_M$ -Effekte zeigen.

Zusätzlich zu diesen schon bekannten Bindungsmutanten zeigen auch die folgenden neu generierten Varianten eine verringerte Aktivität: K132A weist einen relativen  $k_{cat}/K_M$ -Wert von 0.1 auf, hauptsächlich aufgrund eines im Vergleich zum Wildtyp 5fach erhöhten  $K_M$ -Wertes. Die Mutante K60A besitzt 20 % der Wildtyp-Aktivität mit einem 10fach erhöhten  $K_M$ -Wert und kaum verändertem  $k_{cat}$ -Wert. Auch die Mutanten K55A und R125A sind in ihrer Aktivität um 70 % eingeschränkt, wobei der  $K_M$ -Wert gegenüber dem Wildtyp-Enzym verdoppelt, der  $k_{cat}$ -Wert jedoch nur um maximal 40 % verringert ist.

**Tab. 3-3:** Kinetische Parameter der untersuchten Bindungsmutanten der *Serratia* Nuklease. Die Daten wurden mit Hilfe des Hyperchromizitäts-Assays mit hochmolekularer DNA als Substrat gewonnen. Die relativen Werte beziehen sich jeweils auf das Wildtyp-Enzym.

	$k_{\text{cat}}$ [sec <sup>-1</sup> ]	rel. $k_{\text{cat}}$	$K_M$ [μM (nt)]	rel. $K_M$	$k_{\text{cat}} / K_M$ [sec <sup>-1</sup> μM <sup>-1</sup> (nt)]	rel. $k_{\text{cat}} / K_M$
Wt	<b>980</b> ± 88	<b>1</b> ± 0.09	<b>60</b> ± 15	<b>1</b> ± 0.25	<b>16</b> ± 5	<b>1</b> ± 0.33
K48A	<b>738</b> ± 66	<b>0.8</b> ± 0.2	<b>40</b> ± 13	<b>0.7</b> ± 0.2	<b>18.5</b> ± 6.2	<b>1.2</b> ± 0.3
K55A	<b>708</b> ± 88	<b>0.7</b> ± 0.1	<b>139</b> ± 44	<b>2.3</b> ± 0.7	<b>5.1</b> ± 1.7	<b>0.3</b> ± 0.1
R57A <sup>1</sup>	<b>17</b> ± 1	<b>0.02</b> ± 0.001	<b>162</b> ± 86	<b>2.7</b> ± 1.4	<b>0.1</b> ± 0.03	<b>0.006</b> ± 0.002
K60A	<b>2162</b> ± 229	<b>2.2</b> ± 0.2	<b>631</b> ± 110	<b>10.5</b> ± 1.9	<b>3.4</b> ± 0.7	<b>0.2</b> ± 0.04
K84A	<b>1943</b> ± 228	<b>2.0</b> ± 0.2	<b>127</b> ± 35	<b>2.1</b> ± 0.6	<b>15.3</b> ± 4.6	<b>1.0</b> ± 0.3
R87A <sup>1</sup>	<b>333</b> ± 98	<b>0.3</b> ± 0.1	<b>6700</b> ± 4600	<b>111</b> ± 77	<b>0.046</b> ± 0.032	<b>0.003</b> ± 0.002
R125A	<b>585</b> ± 94	<b>0.6</b> ± 0.1	<b>121</b> ± 43	<b>2.0</b> ± 0.7	<b>4.8</b> ± 1.9	<b>0.3</b> ± 0.1
R131A <sup>1</sup>	<b>235</b> ± 59	<b>0.2</b> ± 0.06	<b>2100</b> ± 1200	<b>35</b> ± 20	<b>0.11</b> ± 0.01	<b>0.007</b> ± 0.0007
K132A	<b>464</b> ± 54	<b>0.5</b> ± 0.06	<b>305</b> ± 92	<b>5.1</b> ± 1.5	<b>1.5</b> ± 0.5	<b>0.1</b> ± 0.04
R136A	<b>474</b> ± 30	<b>0.5</b> ± 0.03	<b>84</b> ± 15	<b>1.4</b> ± 0.2	<b>5.6</b> ± 1.1	<b>0.4</b> ± 0.09
K196A	<b>1132</b> ± 121	<b>1.2</b> ± 0.1	<b>183</b> ± 47	<b>3.1</b> ± 0.8	<b>6.2</b> ± 1.7	<b>0.4</b> ± 0.115

<sup>1</sup> Daten aus Friedhoff *et al.*, 1996b.

Der Austausch der Aminosäuren Arg136 und Lys196 gegen Alanin führt in beiden Fällen zu einer um 60 % reduzierten Aktivität gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Während sich dies bei der Mutante K196A in einem um den Faktor 3 erhöhten  $K_M$ -Wert bei unverändertem  $k_{\text{cat}}$ -Wert äußert, sind bei R136A beide Parameter gleichermaßen betroffen, so daß man in diesem Fall nicht von einer  $K_M$ -Mutante sprechen kann. Die Varianten K48A und K84A besitzen nahezu Wildtyp-Aktivität.

### 3.4.1.2 Spaltung kurzer Oligonukleotide zur Kartierung der Bindungsstelle der *Serratia* Nuklease

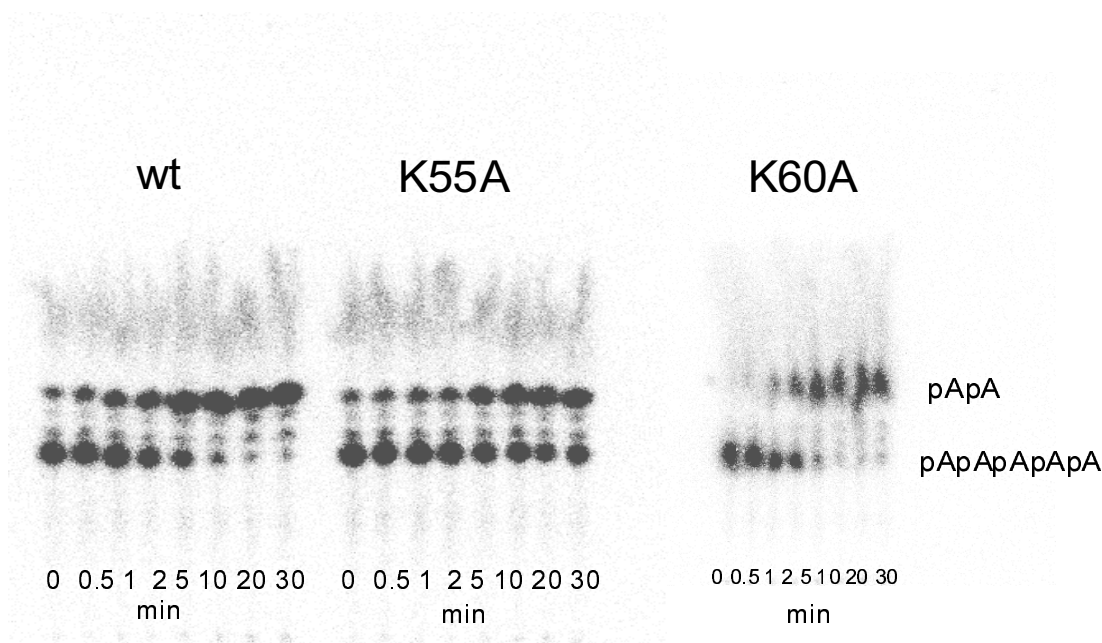
Um weitere Einblicke in die Struktur der Substratbindungsstelle der *Serratia* Nuklease und die Beteiligung der untersuchten Lysin- und Arginin-Reste zu erhalten, wurden Spaltexperimente mit kurzen Oligonukleotiden durchgeführt.

Für eine genauere Kartierung der Bindungsstelle, bei der ein möglicher Kontakt von einer basischen Aminosäure zu einem Phosphat bestimmt werden soll, ist es wichtig, daß die untersuchten Substrate eine möglichst definierte Spaltstelle und damit auch eine definierte Position innerhalb der Bindungstasche besitzen. Zu diesem Zweck wurden das Tetra- und Pentanukleotid  $d(pA)_4$  und  $d(pA)_5$  verwendet, bei denen eine starke Spaltpräferenz zwischen den Positionen 2 und 3 besteht (Friedhoff *et al.*, 1996a). Zusätzlich wurden bei einigen Mutanten die Oligonukleotide der Reihe  $d(A_nGCT_n)$  eingesetzt, wobei  $n$  von 2 bis 6 reicht. Von diesen ist aus früheren Arbeiten bekannt, daß zu Beginn der Hydrolyse durch die *Serratia* Nuklease ein Hauptprodukt gebildet wird, das durch die präferentielle Spaltung zwischen den Basen G und C bzw. zwischen A und G entsteht (Kolmes, 1995). In etwas geringerem Maße wird auch zwischen den Basen A und G bevorzugt gespalten.

Die Oligonukleotide wurden 5' radioaktiv markiert und in Spaltreaktionen mit solchen Mutanten eingesetzt, bei denen aufgrund eines erhöhten  $K_M$ -Wertes gegenüber dem Wildtyp-Enzym eine Beteiligung an der Substratbindung naheliegt. Die Analyse der Spaltprodukte erfolgte mittels Homochromatographie (**Abb. 3-8**).

Zusätzlich wurde die Aktivität der Bindungsmutanten gegenüber dem artifiziellen Minimalsubstrat Thymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn) (s. Kap. 3.3) bestimmt. Die Ergebnisse der Spaltexperimente mit kurzen Substraten sind in **Tab. 3-4** aufgeführt.





**Abb. 3-8:** Homochromatogramm der Spaltung des radioaktiv markierten Pentamers  $d(pA)_5$ . Beispielhaft sind die Hydrolysereaktionen von  $0.5 \mu M$  dieses Substrates durch jeweils  $100 nM$  der Wildtyp-Nuklease sowie der Mutanten K55A und K60A in  $50 mM$  Tris/HCl,  $5 mM$   $MgCl_2$  gezeigt.

Es zeigt sich, daß die Mutanten R57A, R87A und R131A, die gegenüber DNA eine stark verminderte Aktivität aufweisen, auch die kurzen Tetra- und Pentanukleotide nicht meßbar spalten, während das Minimalsubstrat Thymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Geschwindigkeit umgesetzt wird. Letzteres trifft ebenfalls für alle anderen untersuchten Bindungsmutanten zu, was verdeutlicht, daß das eigentliche katalytische Zentrum des Enzyms durch den Austausch eines der elf Arginin- bzw. Lysinreste durch Alanin nicht beeinträchtigt wird.

Für die Variante K132A, die im Hyperchromizitäts-Assay aufgrund eines 10fach erhöhten  $K_M$ -Wertes eine stark verringerte Aktivität aufwies, zeigt sich dagegen eine dem Wildtyp vergleichbare Aktivität gegenüber den kurzen Substraten  $d(pA)_4$  und  $d(pA)_5$ . Auf Grund dieser Diskrepanz zwischen der Spalteffizienz von sehr langen und sehr kurzen Substraten wurden für diese Mutante weitere Aktivitätstests mit Oligonukleotiden von 6 bis 14 Nukleotiden Länge durchgeführt. Alle diese Substrate werden mit etwa 50 % der Wildtyp-Aktivität umgesetzt. Dies deutet, eine bevorzugte Hydrolyse des zentralen Phosphates der Substrate vorausgesetzt, auf eine Beteiligung der Aminosäure Lysin 132 an der Bindung eines Phosphatrestes der DNA hin, das in

einer Entfernung von etwa 2 bis 3 Phosphodiesterbindungen von der zu spaltenden Bindung liegt.

**Tab. 3-4:** Relative Spaltgeschwindigkeiten der untersuchten Mutanten gegenüber kurzen Oligonukleotidsubstraten sowie dem Minimalsubstrat Thymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat, jeweils bezogen auf die Aktivität des Wildtyp-Enzyms. Zum Vergleich ist zusätzlich die relative nukleolytische Aktivität jeder Mutante gegenüber hochmolekularer DNA im Hyperchromizitäts-Assay aufgeführt (vgl. **Tab. 3-3**).

	rel. $k_{\text{cat}}/K_M$ (DNA)	rel. Reaktionsgeschwindigkeiten							rel. $k_{\text{cat}}/K_M$ (npdTpn)
		A <sub>6</sub> GC	A <sub>5</sub> GC	A <sub>4</sub> GC	A <sub>3</sub> GC	A <sub>2</sub> GC	d(pA) <sub>5</sub>	d(pA) <sub>4</sub>	
Wildtyp	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
K48A	1.2						1.2	0.8	1.2
K55A	0.3						0.6	0.4	0.9
R57A	0.006						–	–	2.5
K60A	0.2	0.5	0.9	0.9	1.0	1.3	1.3	1.3	1.4
K84A	1.1						1.0	0.8	1.4
R87A	0.003						–	–	1.5
R125A	0.3	0.3	0.5	0.4	0.5	0.9	1.0	3.6	1.0
R131A	0.007						–	–	4.0
K132A	0.1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.5	0.8	1.0	1.3
R136A	0.4						0.6	0.9	0.8
K196A	0.4						0.6	0.9	1.3

Für das Wildtyp-Enzym wurden folgende Werte bestimmt:  $k_{\text{cat}}/K_M$  (DNA) =  $16 \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}(\text{nt})$ ,  $k_{\text{cat}}/K_M$  (npdTpn) =  $2 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ,  $v$  (14mer) =  $40 \text{ min}^{-1}$ ,  $v$  (12mer) =  $37 \text{ min}^{-1}$ ,  $v$  (10mer) =  $40 \text{ min}^{-1}$ ,  $v$  (8mer) =  $53 \text{ min}^{-1}$ ,  $v$  (6mer) =  $19 \text{ min}^{-1}$ ,  $v$  (5mer) =  $1 \text{ min}^{-1}$ , und  $v$  (4mer) =  $0.02 \text{ min}^{-1}$ .

Alle Reaktionen wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub> bei Raumtemperatur durchgeführt.

Ähnliches läßt sich aus den Daten für die Mutante K60A schlußfolgern: Hochmolekulare DNA und das 14mer Oligonukleotid werden mit 20 bzw. 50 %iger Aktivität relativ zum Wildtyp gespalten, während der Austausch dieses Lysins bei der Bindung und Spaltung kürzerer

Substrate offensichtlich keine Auswirkungen hat; diese werden mit einer dem Wildtyp-Enzym vergleichbaren Geschwindigkeit umgesetzt. Die Seitenkette des Lysin 60 stellt also möglicherweise einen Kontakt zu einem Phosphat her, das sich 6 bis 7 Nukleotide von der zu spaltenden Bindung entfernt befindet.

Bei der Nuklease-Variante K196A tritt der Übergang von reduzierter Aktivität bis zu Wildtyp-Aktivität bei einer Substratlänge von weniger als 5 Nukleotiden auf. Ähnliches gilt für den Austausch des Arginin an der Position 136 gegen Alanin, weshalb für diese Mutanten keine Untersuchung der Spalteffizienz von Substraten mittlerer Länge durchgeführt wurde.

An der Position 125 hat eine Mutation gegen Alanin keinen Einfluß auf die Spaltung von Substraten von weniger als 8 Nukleotiden Länge, während längere Substrate mit höchstens halbmaximaler Geschwindigkeit verglichen mit der Wildtyp-Nuklease umgesetzt werden. Bei der Variante K55A dagegen wird eine dem Wildtyp-Enzym vergleichbare Aktivität erst gegenüber dem Minimalsubstrat Thymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat erreicht, was eine Beteiligung an der Bindung von Phosphaten nahelegt, die sich direkt benachbart von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung befinden.

Der Austausch der Lysine an den Positionen 48 und 84 hat keine Auswirkungen auf die Spaltung unterschiedlich langer Oligonukleotide: Alle untersuchten Substrate werden nahezu mit Wildtyp-Aktivität umgesetzt.

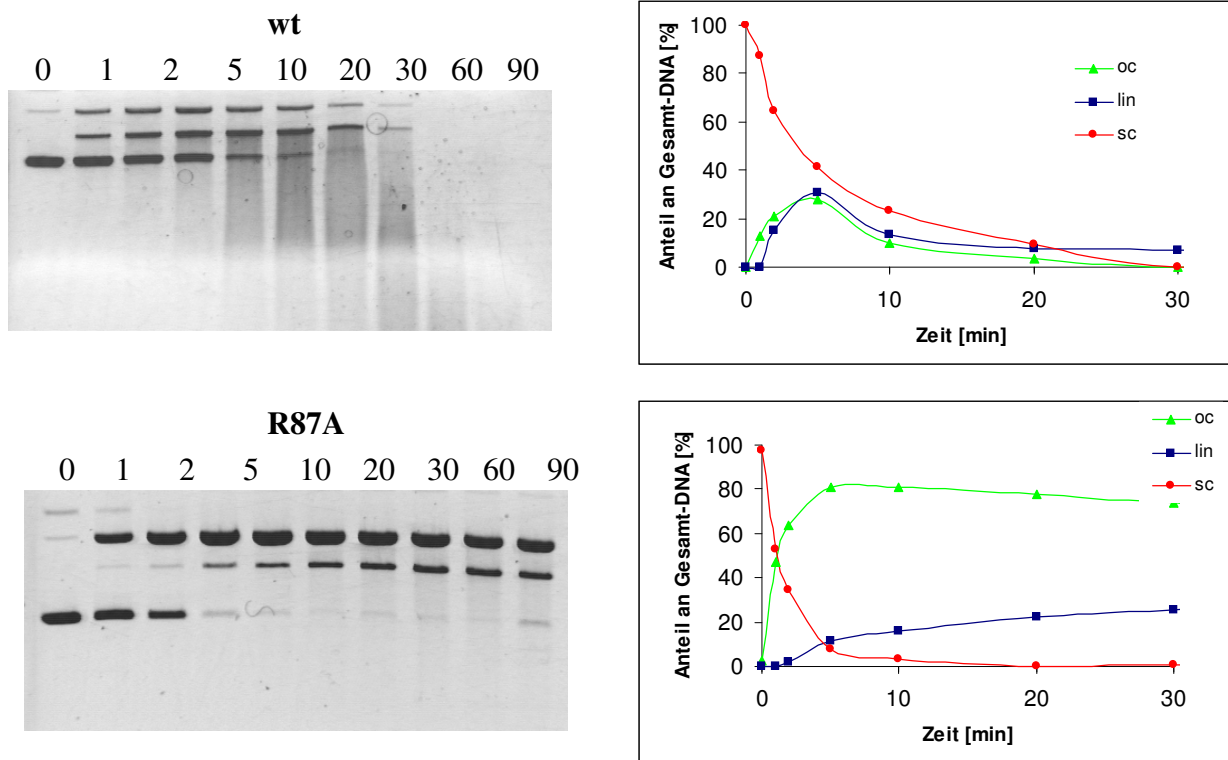
### **3.4.2 Plasmidspaltkinetiken zur Analyse des Bindungsverhaltens der Nuklease-Varianten**

Für die unspezifische humane Endonuklease DNase I konnten durch den gezielten Austausch von insgesamt drei Aminosäureresten im Bereich der Substratbindungsstelle gegen basische Aminosäuren extrem aktive Enzymvarianten generiert werden, die bei der Spaltung überspiralisierter Plasmid-DNA eine verstärkte Tendenz zur Bildung linearer DNA besitzen (Pan & Lazarus, 1997). Dies steht im Gegensatz zum Spaltverhalten der Wildtyp-Nuklease, die bei der Hydrolyse von Plasmiden hauptsächlich offen zirkuläre DNA als erstes Produkt generiert. Das Ergebnis wurde, auch aufgrund der geringeren  $K_M$ -Werte der Varianten, auf eine stärkere Affinität dieser Mutanten für das Substrat zurückgeführt, die eine langsamere Dissoziation des

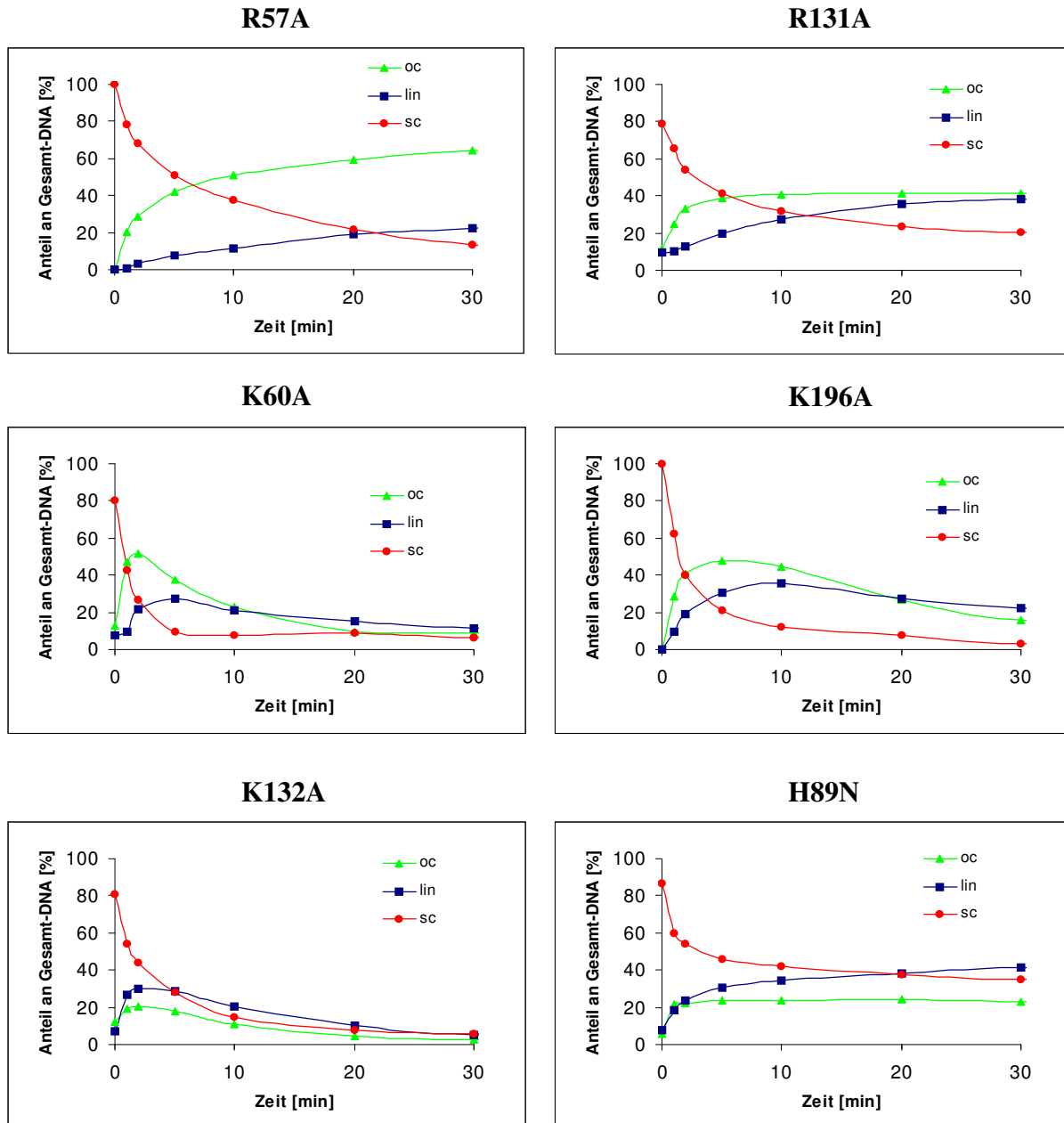
Produktes nach einer Einzelstrangspaltung und damit eine größere Wahrscheinlichkeit für Doppelstrangbrüche zur Folge hat.

Analog zu diesen Studien an DNase I wurde mit den Bindungsmutanten der *Serratia* Nuklease ein Plasmid-Spaltassay an überspiralasierter DNA durchgeführt, um zu untersuchen, ob die verringerte Substrataffinität einiger Enzymvarianten Auswirkungen auf die Verteilung der Produktspezies hat.

Die Ergebnisse sind in **Abb. 3-9** und **Abb. 3-10** dargestellt. Deutlich ist dabei der Unterschied zwischen der Produktverteilung der Wildtyp-Nuklease und derjenigen Varianten, die bezüglich der kinetischen Parameter die größten  $K_M$ -Effekte gezeigt hatten (s. **Tab. 3-3**), wie beispielsweise die Mutante R87A.



**Abb. 3-9:** Spaltung von überspiralierter Plasmid-DNA durch die Wildtyp-Nuklease sowie die Mutante R87A als Beispiel für die extrem unterschiedliche Verteilung der Produktspezies. Links ist die Auftrennung der DNA auf 0.8 %igen TBE-Agarose-Gelen gezeigt, während auf der rechten Seite nach densitometrischer Auswertung der Gele der Anteil des jeweiligen Produktes an der Gesamt-DNA gegen die Zeit aufgetragen ist. Es wurde jeweils 0.02  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  des Plasmids pBSK<sup>+</sup> durch 1000 K.U./l Enzym in 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub> gespalten.



**Abb. 3-10:** Verteilung der Produktspezies bei der Spaltung von überspiralisierter Plasmid-DNA durch ausgewählte Varianten der *Serratia* Nuklease (0.02 µg/µl pBSK<sup>+</sup>, 1000 K.U./l Enzym, 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>). Die dazugehörigen Agarose-Gele sind im Anhang (Kap. 7.4.1) abgebildet.

Bei der Spaltung überspiralisierter (*sc*) Plasmid-DNA durch den Wildtyp tritt in etwa gleichem Maße eine Bande von offen zirkulärer (*oc*) sowie linearer (*lin*) DNA auf, bevor im weiteren Verlauf der Reaktion kleinere lineare DNA-Fragmente entstehen, die als „Schmier“ im Agarosegel zu erkennen sind. Dies bedeutet, daß die *Serratia* Wildtyp-Nuklease

überspiralisierte Plasmid-DNA durch eine Reihe schnell aufeinander folgender Einzelstrangspaltungen („nicks“) sehr schnell linearisiert, ohne daß offen zirkuläre Produktspezies akkumuliert werden. Im Gegensatz hierzu wird im Laufe der Spaltreaktion durch bestimmte Nuklease-Varianten verstärkt *oc*-Plasmid gebildet. Hier werden demnach zunächst eine größere Anzahl statistisch verteilter Einzelstrangspaltungen erzeugt, die dann im Verlauf der weiteren Reaktion erst allmählich zu einer Linearisierung des Substrates führen. Besonders extrem ist dieser Unterschied in der Verteilung der Produktspezies für die Mutante R87A (**Abb. 3-9**), die gleichzeitig die Variante mit der größten Abweichung des  $K_M$ -Wertes ist ( $K_M$  relativ zum Wildtyp 111fach erhöht). Hier wird *oc*-Plasmid bis zu einem Anteil von 80 % der Gesamt-DNA-Menge akkumuliert.

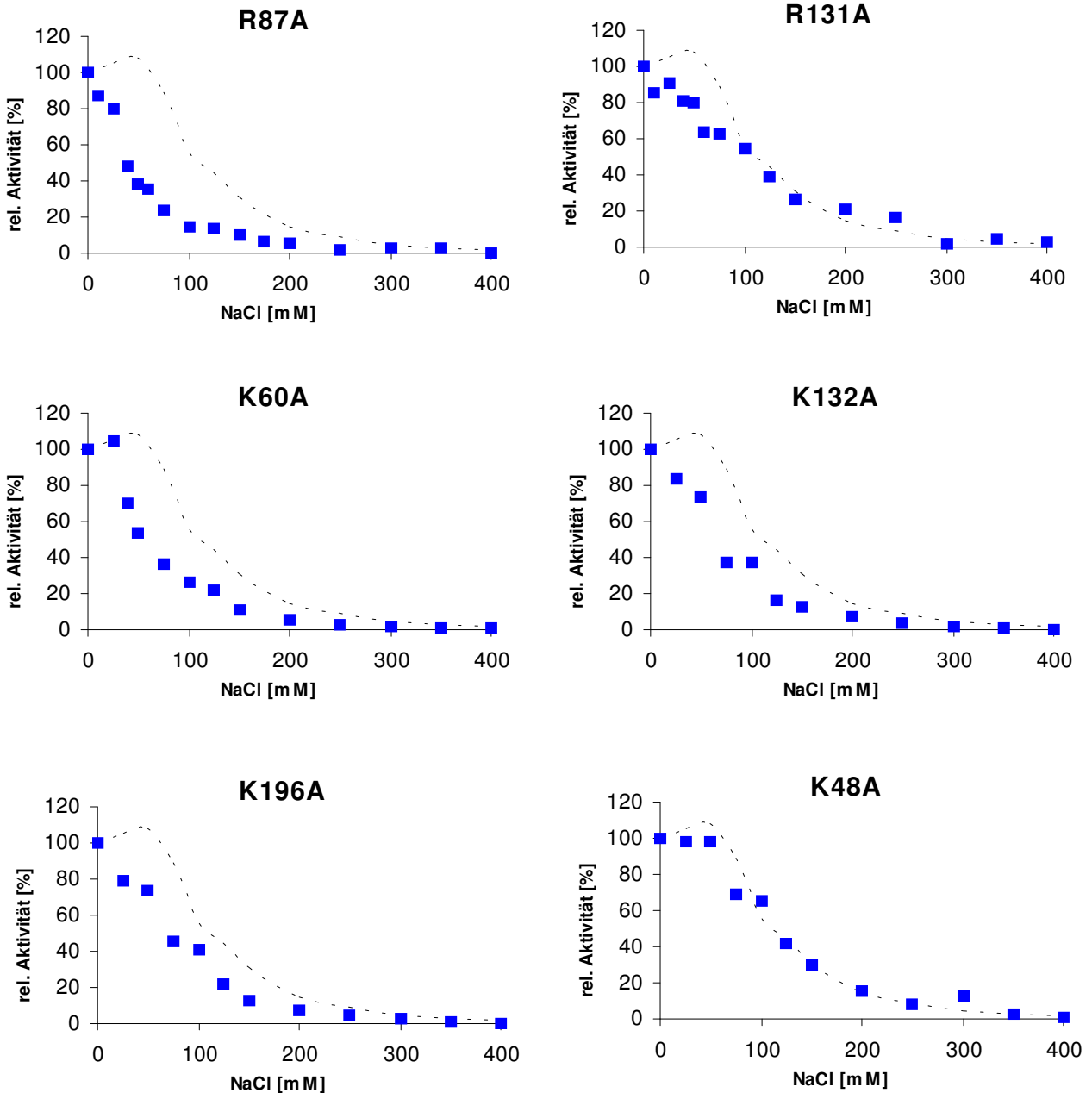
Eine ähnliche Tendenz zur Akkumulation von *oc*-Plasmid, wenn auch in weniger ausgeprägter Form, zeigen auch die  $K_M$ -Mutanten R131A, K60A und K196A, während die Nuklease-Varianten K48A, K55A, K84A, R125A, K132A und R136A eine dem Wildtyp-Enzym ähnliche Verteilung der Produktspezies mit z.T. stärkerer Bildung linearer DNA aufweisen (die Gele und die zugehörigen Auswertungen sind im Anhang (Kap. 7.4.2) gezeigt). Die Mutante R57A, die keine  $K_M$ -Mutante sondern vielmehr im  $k_{cat}$ -Wert beeinträchtigt ist, zeigt ähnlich wie die Variante R87A ebenfalls eine starke Akkumulation von *oc*-Plasmid-DNA, während die *active site*-Mutante H89N eine vergleichbare Produktverteilung aufweist wie der Wildtyp.

Es läßt sich also zusammenfassen, daß solche Nuklease-Varianten, die bei der Spaltung hochmolekularer DNA im Kunitz-Assay durch einen erhöhten  $K_M$ -Wert auffallen und daher als in der Substratbindung beeinträchtigt gelten können, bei der Spaltung überspiralisierter Plasmid-DNA eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Verteilung der Produktspezies zeigen: Es wird in verstärktem Maße offen zirkuläre DNA akkumuliert, was auf eine höhere Zahl nur vereinzelt und statistisch gesetzter Einzelstrangspaltungen zurückzuführen ist. Eine Ausnahme bildet die Mutante K132A, die sich trotz eines 5fach erhöhten  $K_M$ -Wertes im Plasmid-Spaltassay wie der Wildtyp verhält, sowie die Variante R57A, bei der ähnlich wie bei der Mutante R87A verstärkt *oc*-DNA gebildet wird.

### 3.4.3 Salzabhängigkeit verschiedener Nuklease-Varianten

Zur weiteren Charakterisierung der Bindungseigenschaften bestimmter Mutanten der *Serratia* Nuklease wurde deren Salzabhängigkeit untersucht. Dazu wurde im Hyperchromizitäts-Assay

die Aktivität der jeweiligen Mutante unter dem Einfluß von steigenden Mengen NaCl bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3-11** gezeigt.



**Abb. 3-11:** Abhängigkeit der nukleolytischen Aktivität einiger Enzymvarianten von der Salzkonzentration. Zum Vergleich ist jeweils der Kurvenverlauf für die Wildtyp-Nuklease gezeigt (gestrichelt). Die Aktivität wurde im Hyperchromizitäts-Assay unter folgenden Bedingungen bestimmt: 0.05 mg/ml Heringsspermien-DNA, 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 000 K.U./l Enzym, 0 bis 400 mM NaCl, RT.

Die Wildtyp-Nuklease zeigt maximale Aktivität bei einer Salzkonzentration von 50 mM NaCl, während höhere Konzentrationen stark inhibierend wirken (Merck, 1989).

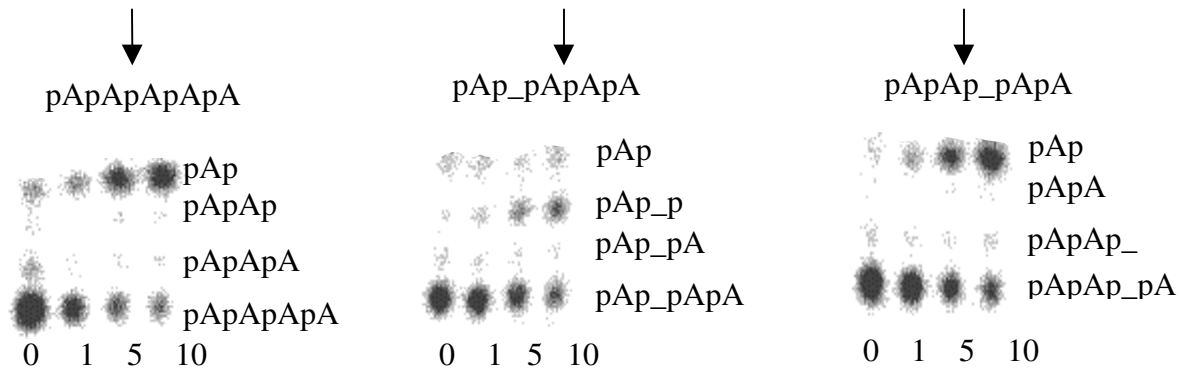
Demgegenüber zeigen diejenigen Nuklease-Varianten, die einen  $K_M$ -Effekt gezeigt hatten und die vermutlich an der Substratbindung beteiligt sind (R87A, R131A, K60A, K132A und K196A) eine sehr viel stärkere Abhängigkeit ihrer nukleolytischen Aktivität von der Salzkonzentration: Schon bei geringen NaCl-Konzentrationen von 10 bis 25 mM ist die Aktivität der meisten Bindungsmutanten um etwa 20 % reduziert und fällt mit steigender Salzkonzentration schneller ab als bei der Wildtyp-Nuklease. Am deutlichsten gilt dies wiederum für die stärkste  $K_M$ -Variante R87A.

Dagegen weist die Mutante K48A einen dem Wildtyp ähnlichen Kurvenverlauf auf, was zeigt, daß eine stärkere Sensitivität einer Mutante gegenüber der Salzkonzentration mit deren Bindungsdefizienz ( $K_M$ -Wert erhöht) korreliert ist.

### 3.5 Charakterisierung der Nuklease-Varianten Y76A und W123A

Ausgehend von früheren Arbeiten, nach denen den aromatischen Aminosäureresten Tyr76 und Trp123 eine Funktion bei der Erhaltung der strukturellen Integrität der *Serratia* Nuklease bzw. bei der Substratbindung zugesprochen wurde (Meiss *et al.*, 1999, 2000), sollte letzteres in dieser Arbeit näher untersucht werden. Da einige Nukleasen, wie z.B. Vertreter der RNase T<sub>1</sub>-Familie und viele RNA-bindende Proteine, u.a. über Interkalation von aromatischen Resten zwischen die Basen der Nukleinsäure ihr Substrat binden, wurde diese Möglichkeit für die Aminosäuren Tyr76 und Trp123 der *Serratia* Nuklease mit Hilfe von Spaltkinetiken an Oligonukleotiden mit abasischen *sites* untersucht. Hierzu wurden die Pentanukleotide d(A\_AAA) und d(AA\_AA) sowie die Dodekamere d(AAAAAA\_CTTTTT) und d(AAAAAAG\_TTTTTT) (ein Unterstrich kennzeichnet jeweils die Position der fehlenden Base) und zusätzlich die jeweils unmodifizierten Oligonukleotide als radioaktiv markierte Substrate mit dem Wildtyp-Enzym, den Nuklease-Varianten Y76A, W123A und zur Kontrolle mit der Mutante K48A umgesetzt und die Reaktion mittels Homochromatographie analysiert. Dabei mußten die Enzyme aufgrund der sehr geringen Umsatzgeschwindigkeit von Pentameren in starkem Überschuß zugegeben werden.





**Abb. 3-12:** Homochromatogramme zur Analyse der Spaltung eines unmodifizierten und zweier Pentamere, bei denen jeweils eine Base fehlt. Hier ist die Reaktion für die Wildtyp-Nuklease gezeigt; die übrigen untersuchten Varianten setzen die Substrate zwar langsamer um, jedoch ergibt sich die gleiche Produktverteilung. Jeweils  $0.5 \mu\text{M}$  der radioaktiv markierten Substrate wurden in  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl, pH 8.2,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  durch  $60 \text{ nM}$  Enzym im Fall des unmodifizierten Oligonukleotids bzw.  $7 \mu\text{M}$  Nuklease bei den modifizierten Pentameren bei Raumtemperatur umgesetzt. Ein Unterstrich kennzeichnet die Position der fehlenden Base, der Pfeil deutet auf die bevorzugte Spaltstelle.

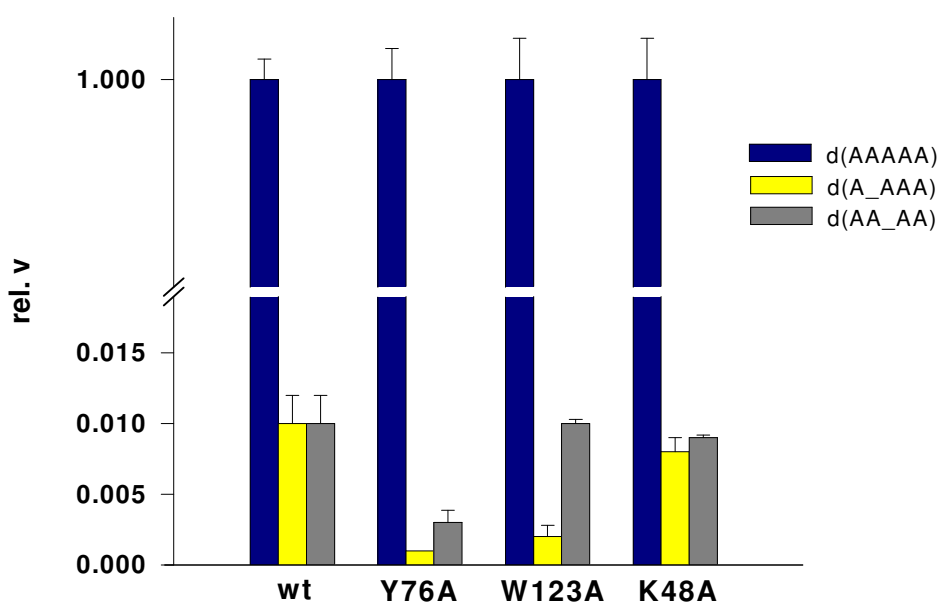
**Tab. 3-5:** Apparente und relative, jeweils auf das unmodifizierte Pentamer bezogene Reaktionsgeschwindigkeiten der Spaltung der Oligonukleotide mit einer abasischen *site* durch die Wildtyp-Nuklease sowie die Varianten Y76A, W123A und K48A. Zum Vergleich sind zusätzlich die relativen spezifischen Aktivitäten gegenüber hochmolekularer DNA, gemessen im Kunitz-Assay, genannt.

Enzym	DNA	pApApApApA		pAp_pApApA		pApAp_pApA	
		v [ $\text{min}^{-1}$ ]	rel.v	v [ $\text{min}^{-1}$ ]	rel.v	v [ $\text{min}^{-1}$ ]	rel.v
Wildtyp	1	3.3	1	0.035	0.01	0.035	0.01
Y76A	0.015	0.0069	1	< 0.00001	< 0.001	0.00002	0.003
W123A	0.23	0.022	1	0.00005	0.002	0.00022	0.01
K48A	1.2	2.0	1	0.016	0.008	0.017	0.009

Reaktionsbedingungen:  $0.5 \mu\text{M}$  Substrat,  $5 \times 10^6 \text{ K.U./l}$  Enzym beim unmodifizierten Substrat bzw.  $9 \times 10^8 \text{ K.U./l}$  bei den modifizierten Pentameren,  $50 \text{ mM}$  Tris/HCl, pH 8.2,  $5 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ .

Bei der Spaltung der verschiedenen Pentamere (**Abb. 3-12**) fällt auf, daß bei dem unmodifizierten Substrat sowie bei demjenigen Oligonukleotid, bei dem die dritte Base fehlt, jeweils die zweite Phosphodiesterbindung die bevorzugte Spaltstelle darstellt, während sich diese um eine Position in 3'-Richtung verschiebt, wenn das zweite Adenin nicht vorhanden ist.

Die Ergebnisse der Spaltung der verschiedenen Pentamere sind in **Tab. 3-5** aufgeführt sowie in der **Abb. 3-13** graphisch dargestellt.



**Abb. 3-13:** Graphische Darstellung der in **Tab. 3-5** aufgeführten relativen Geschwindigkeiten der Spaltung von Pentameren mit abasischen *sites*, jeweils bezogen auf die Spaltung des unmodifizierten Oligonukleotids.

Das unmodifizierte Pentamer wird von allen untersuchten Enzym-Varianten mit der größten Geschwindigkeit umgesetzt. Doch während die modifizierten Substrate, unabhängig von der Position der abasischen *site*, beide mit einer um den Faktor 100 herabgesetzten Aktivität gespalten werden, gibt es insbesondere bei der Mutante W123A signifikante Unterschiede zwischen den Substraten: Fehlt die Base an der dritten Position, so wird dieses Oligonukleotid mit der gleichen Geschwindigkeit gespalten wie von der Wildtyp-Nuklease. Das Fehlen des zweiten Adenins jedoch hat zur Folge, daß die Aktivität um das 5fache reduziert ist. Der Austausch des Tryptophan 123 gegen Alanin hat also zur Folge, daß das Enzym sensitiv

gegenüber dem Vorhandensein oder Fehlen einer Base 5' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung wird.

Bei der Mutante Y76A tritt dieser Unterschied zwischen den modifizierten Substraten so nicht auf, sondern beide werden mit einer gegenüber dem unmodifizierten Oligonukleotid stark verminderten Aktivität umgesetzt, allerdings das eine mehr als das andere. Die Variante K48A, die offensichtlich nicht an der Substratbindung beteiligt ist (s. Kap. 3.4), verhält sich erwartungsgemäß allen untersuchten Substraten gegenüber wie der Wildtyp.

Bei der Spaltung der untersuchten Dodekamere (**Tab. 3-6**) hat eine fehlende Base in den zentralen Positionen lediglich den Effekt, daß diese Oligonukleotide langsamer umgesetzt werden, wobei jedoch für keine Nuklease-Variante ein signifikanter Unterschied in der Spaltgeschwindigkeit der beiden modifizierten Substrate zu beobachten ist.

**Tab. 3-6:** Apparente Geschwindigkeit der Spaltung von Dodekameren mit jeweils einer abasischen *site* relativ zu der des unmodifizierten Oligonukleotids. Der Unterstrich kennzeichnet die Position der fehlenden Base. Die Analyse erfolgte mittels Homochromatographie.

Enzym	d(AAAAAGCTTTTT)	d(AAAAA_CTTTTT)	d(AAAAAG_TTTTT)
Wildtyp	1	0.09	0.08
Y76A	1	0.22	0.16
W123A	1	0.09	0.05

Reaktionsbedingungen: 0.5 µM Substrat, 1 nM-5 µM Enzym, 50 mM Tris/HCl, pH 8.2, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, RT.

Zusammenfassend läßt sich für die Aminosäure Trp123 der *Serratia* Nuklease sagen, daß der Austausch dieses aromatischen Restes gegen Alanin durchaus Auswirkungen auf die Spaltung eines Substrates hat, welches 5' von der bevorzugten Spaltposition eine fehlende Base aufweist, während eine abasische *site* in 3'-Richtung für diese Mutante ohne Auswirkungen bleibt.

Dagegen führt der Austausch des Tyrosin 76 gegen Alanin zu einer Enzymvariante, die beide modifizierten Substrate mit reduzierter Aktivität umsetzt, dasjenige mit der fehlenden Base 5'

neben der zu spaltenden Bindung jedoch weniger effektiv als das mit der fehlenden Base 3' neben der zu spaltenden Phosphodiesterbindung.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Produktion rekombinanter Formen der *Serratia* Nuklease

Die kinetische und funktionelle Charakterisierung von Varianten der Nuklease aus *Serratia marcescens* hinsichtlich Bindung und Katalyse steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Die hierzu benötigten Mutanten wurden über eine gerichtete Mutagenese generiert und, ebenso wie der Wildtyp, als rekombinante Proteine mit einem N-terminalen Met-(His)<sub>6</sub>-Gly-Ser-tag aus Bakterienkulturen von *Escherichia coli* aufgereinigt (Kap. 3.1). Dabei ist die hier verwendete 2-Schritt-PCR eine etablierte Methode zur gezielten Einführung von Mutationen in ein Gen (Ito *et al.*, 1991; Friedhoff *et al.*, 1994b), wenn es auch inzwischen bequemere und schnellere Techniken gibt wie z.B. die PCR-Mutagenese unter Anwendung einer inversen PCR (Meiss, 1997). Der sog. His-tag hat den Vorteil, daß die in *E. coli* überexprimierten Proteine über die Technik der Affinitätschromatographie sehr sauber und in größeren Mengen aufgereinigt werden können. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, daß der His-tag der rekombinanten Proteine im Vergleich zur nativen Nuklease SM6Nuc, die aus Kulturüberständen von *Serratia marcescens* gewonnen worden war, zu keinem Unterschied im kinetischen Verhalten der Enzyme führt (Friedhoff, 1995).

### 4.2 Beiträge zur Aufklärung des Katalysemechanismus der *Serratia* Nuklease

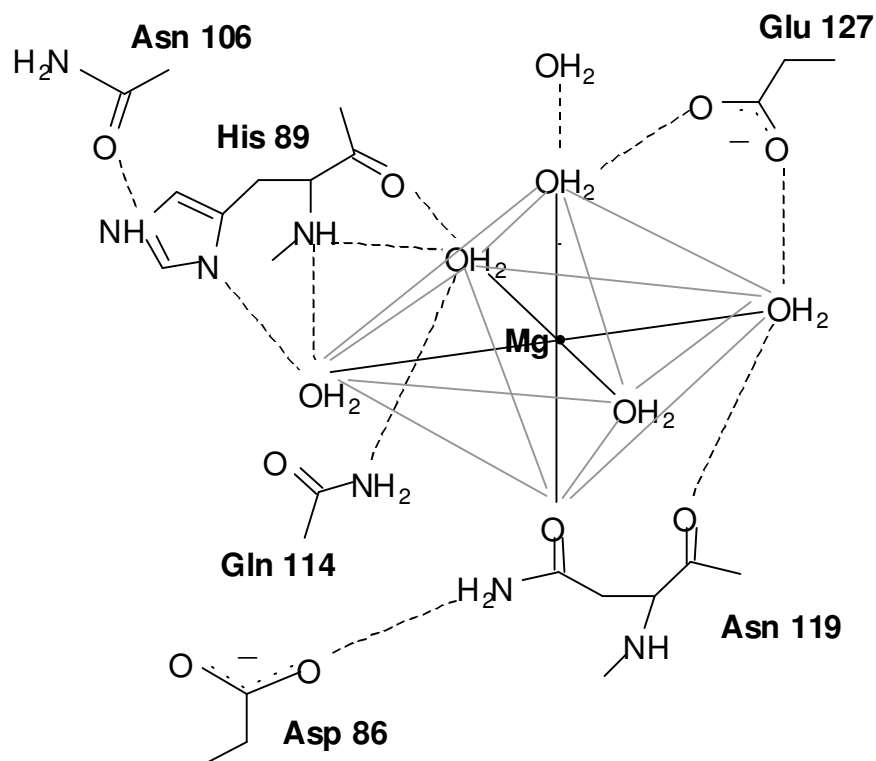
#### 4.2.1 Die Rolle des Asparagin 119

Das Asparagin an der Position 119 ist neben dem Histidin 89 eine der beiden Aminosäuren, die für den Katalysemechanismus der *Serratia* Nuklease essentiell sind, und deren Austausch zu Enzymvarianten führt, die in ihrer Aktivität drastisch eingeschränkt bzw. völlig inaktiv sind (Friedhoff *et al.*, 1996b). Ausgehend von diesen Ergebnissen der Mutagenesestudien wurden im

Rahmen der vorliegenden Arbeit Experimente durchgeführt, bei denen die Aktivität von Mutanten, bei denen an der Position 119 ein Aminosäureaustausch vorliegt, unter verschiedenen pH- und Cofaktorbedingungen analysiert wurde (Kap. 3.2).

Schon bevor die Struktur des Magnesium-Wasser-Clusters der *Serratia* Nuklease 1999 im Detail aufgeklärt werden konnte (Miller *et al.*, 1999), wurde eine für Proteine ungewöhnliche Beteiligung des Asparaginrestes an der Koordinierung des Metallions in Erwägung gezogen. Die während dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten diese Theorie unterstützen. Deren Ergebnisse können jetzt, nachdem genaue Strukturdaten vorliegen, auch hinsichtlich der Interaktion des Asparagin mit dem Magnesiumion diskutiert werden.

Die Aminosäure Asn119 ist die einzige Proteinkomponente, die direkt mit dem essentiellen Magnesium im aktiven Zentrum der *Serratia* Nuklease verbunden ist, und zwar über das Sauerstoffatom seiner Amidseitenkette (Abb. 4-1). Die übrigen 5 Koordinationsstellen des zentralen  $Mg^{2+}$ -Ions werden von Wassermolekülen des Lösungsmittels besetzt.



**Abb. 4-1:** Schema der Magnesium-Bindungsstelle der *Serratia* Nuklease. Die sechs das Magnesium-Ion koordinierenden Moleküle des *clusters* bilden ein Oktaeder (graue Linien). Interaktionen zwischen Aminosäuren des aktiven Zentrums und dem *cluster* sind gestrichelt gezeichnet mit Ausnahme der Bindung zwischen dem Asparagin 119 und dem  $Mg^{2+}$ -Ion, die direkt und nicht wasservermittelt ist (nach Miller *et al.*, 1999).

Eine solche Anordnung einer Metallbindungsstelle, wie sie bei der *Serratia* Nuklease sowie auch im strukturell ähnlichen aktiven Zentrum der *Homing*-Endonuklease I-PpoI zu finden ist, ist einmalig in der Gruppe aller magnesiumionenbindenden Proteine (Miller *et al.*, 1999): Entweder wird das  $Mg^{2+}$ -Ion von Carboxylgruppen, oder von Amidgruppen in Verbindung mit sauren Aminosäuren wie Aspartat oder Glutamat koordiniert (Jernigan *et al.*, 1994).

Durch den Austausch des Asparagin 119 gegen Asparaginsäure ist das pH-Profil der entsprechenden Variante gegenüber dem der Wildtyp-Nuklease erheblich verändert (s. Kap. 3.2.1): Statt eines pH-Optimums bei pH 8.5 wie beim Wildtyp ist es bei der Mutante N119D stark zu kleineren pH-Werten (pH 5.5) verschoben. Bei pH-Werten  $>5.5$  fällt die Aktivität der Nuklease-Variante rasch ab. Das eingefügte Aspartat wird an dieser Position offensichtlich nur in protonierter Form toleriert (die sauren Aminosäurereste Glutamat und Aspartat weisen in Proteinen  $pK_a$ -Werte von etwa 4 bis 4.5 auf). Dies erscheint auf den ersten Blick widersinnig, da ein negativ geladener Rest ein besserer und auch verbreiteter Ligand für ein positiv geladenes Metallion ist als ein Asparagin. Doch zeigt die strikte Konservierung dieses Asparaginrestes innerhalb der Familie der unspezifischen Nukleasen des *Serratia*-Typs (s. **Abb. 1-3** der Einleitung), daß eine ungeladene Aminosäure an dieser Stelle von der Evolution stark bevorzugt wurde. Die nötige Elektronegativität wird hier durch die Interaktion der Asparaginseitenkette mit der Aminosäure Asp86 hergestellt (**Abb. 4-1**). Eine negative Ladung könnte hier, möglicherweise durch eine Veränderung der Bindungslängen zwischen den einzelnen Komponenten, die gesamte Geometrie des aktiven Zentrums derart stören, daß die Aktivität des Enzyms beeinträchtigt würde. Weiterhin könnte eine zu starke negative Ladung an dieser Stelle die korrekte Positionierung einer ebenfalls negativ geladenen Nukleinsäure behindern.

Verschiedene Nuklease-Varianten mit Aminosäureaustauschen an der Position 119 zeigen eine z.T. stark relaxierte Abhängigkeit von unterschiedlichen Metallionen (Kap. 3.2.2). Während die Wildtyp-Nuklease das Magnesiumion als Cofaktor bevorzugt, welches mit geringen Aktivitätsverlusten durch ein Manganion ersetzt werden kann, zeigen die Mutanten N119Q und N119D eine erhöhte Aktivität mit anderen zweiwertigen Metallionen wie  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cd^{2+}$ . Unter allen bisher untersuchten Nuklease-Varianten weisen diese beiden N119-Mutanten die größten Metallionen-Effekte auf (Friedhoff, 1995). Diese Tatsache wurde schon vor Bekanntwerden der genauen Struktur der  $Mg^{2+}$ -Bindungsstelle als Indiz für eine direkte oder

zumindest indirekte Beteiligung der Aminosäure Asn119 an der Metallionenkoordinierung erkannt.

Möglicherweise ist die unterschiedliche Geometrie bzw. Koordinationszahl der verwendeten Metallionen für die veränderte Metallionenabhängigkeit der Mutanten verantwortlich: So können beispielsweise  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Zn}^{2+}$  auch tetraedrisch koordiniert und mit lediglich 4 Liganden vorkommen. Eine solche Anordnung könnte die durch einen Aminosäureaustausch veränderte Struktur der Metallionenbindungsstelle ausgleichen und die mit Magnesiumionen stark reduzierte Aktivität der N119-Mutanten somit steigern.

Eine Veränderung der Geometrie des aktiven Zentrums durch einen Aminosäureaustausch könnte auch die Erfordernis höherer  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen für eine maximale Aktivität der Mutante N119D erklären (s. Kap. 3.2.2): Eine suboptimale Anordnung der an der Metallionenbindung beteiligten Aminosäuren kann die Funktion der Nuklease soweit beeinträchtigen, daß höhere Konzentrationen des Cofaktors erforderlich sind, um Sättigung und damit größere Hydrolysegeschwindigkeiten zu erreichen.

Ausgehend von der Struktur des aktiven Zentrums der *Serratia* Nuklease und in Einklang mit der Geometrie des Metallionen-Wasser-Clusters wurden zwei mögliche Funktionen des Cofaktors bei der Katalyse vorgeschlagen (Miller *et al.*, 1999): Einerseits könnte ein Wassermolekül aus der Hydrathülle des Magnesiumions dazu dienen, nach der Spaltung der Phosphodiesterbindung die Abgangsgruppe zu protonieren (Friedhoff *et al.*, 1996b), wie es beispielsweise auch für ein magnesiumionengebundenes Wasser in den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *EcoRV* angenommen wird (Jeltsch *et al.*, 1993). Andererseits könnte ein solches magnesiumgebundenes Wasser direkt von der allgemeinen Base (His89, s.u. Kap. 4.2.2.1) aktiviert werden und somit das die Phosphodiesterbindung angreifende Nukleophil bilden. In beiden Fällen könnte das  $\text{Mg}^{2+}$ -Ion zusätzlich dazu dienen, den pentakovalenten Übergangszustand zu stabilisieren. In Anbetracht dessen, daß der genaue Katalysemechanismus der *Serratia* Nuklease und insbesondere die Funktion des Magnesiumions noch nicht geklärt werden konnte, ist es durchaus denkbar, daß andere zweiwertige Metallionen wie  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  oder  $\text{Cd}^{2+}$  die Aufgaben des Cofaktors besser übernehmen können, wenn das Asn119 als wichtiger Ligand fehlt bzw. durch andere Aminosäuren ersetzt wird. Eine solche Promiskuität in der Verwendung verschiedener Metallionen als Cofaktor spricht eher für eine Rolle des Kations bei der Stabilisierung des Phosphoanions des Übergangszustandes, während eine größere Sensitivität der Hydrolysereaktion hinsichtlich verschiedener Metallionen, wie sie in Untersuchungen der



Restriktionsendonuklease *EcoRV* aufgezeigt wurde (Baldwin *et al.*, 1999), eher mit einer Aufgabe bei der präzisen Positionierung und Aktivierung eines Nukleophils vereinbart werden kann (Galburt *et al.*, 1999).

Eine Funktion des Metallion-Cofaktors bei der Aktivierung eines Wassermoleküls, welches auf diese Weise als Nukleophil dienen würde, konnte jüngst für die *Homing*-Endonuklease I-*PpoI* durch den Vergleich von Elektronendichte-Verteilungen des ungespaltenen Enzym-Substrat-Komplexes mit denen des Produkt-Komplexes ausgeschlossen werden (Galburt *et al.*, 1999). In diesen Untersuchungen wurde deutlich, daß die Positionierung des Metallions zwar eine Interaktion mit der zu spaltenden Phosphodiesterbindung, jedoch keine Koordinierung eines Wassermoleküls für einen direkten nukleophilen *in line*-Angriff erlaubt. Aufgrund der Ähnlichkeit der aktiven Zentren von I-*PpoI* und der *Serratia* Nuklease (s. Kap. 1.2.3) ist für letztere eine Funktion des Magnesium-Ions als Lewis-Säure zur direkten Aktivierung eines Nukleophils ebenfalls unwahrscheinlich geworden.

Das Ergebnis der Untersuchung der Metallionenabhängigkeit der Mutante N119H ist besonders interessant im Hinblick auf die strukturelle Ähnlichkeit der aktiven Zentren der *Serratia* Nuklease und des Colicins E9 (Kühlmann *et al.*, 1999; s. Kap. 1.2.3), bei dem sich an der dem Asparagin 119 der *Serratia* Nuklease entsprechenden Position ein Histidin-Rest befindet, welches hier an der Koordinierung eines  $\text{Ni}^{2+}$ - bzw.  $\text{Zn}^{2+}$ -Ions beteiligt ist. Eine Nachahmung dieser Situation bei der *Serratia* Nuklease ergibt eine Enzymvariante, die relativ zum Wildtyp mit  $\text{Ni}^{2+}$  eine 3- bis 4fach gesteigerte Aktivität aufweist. Die Kombination eines Histidinrestes an der Position 119 mit einem  $\text{Ni}^{2+}$ -Ion scheint demnach an dieser Stelle eine durchaus funktionelle Alternative zur Metallionenbindungsstelle, wie sie in der *Serratia* Nuklease verwirklicht ist, zu sein.

#### **4.2.2 Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat - Ein neues Minimalsubstrat der *Serratia* Nuklease**

Bei der kinetischen Untersuchung der Spaltung hochmolekularer Substrate durch die *Serratia* Nuklease besteht, wie für alle unspezifischen Nukleasen, das Problem, daß prinzipiell nicht zwischen Substrat und Produkt unterschieden werden kann, da bei der Spaltung langer

Nukleinsäuren jedes intermediäre Produkt wiederum gespalten werden kann. Hinzu kommt die Heterogenität eines natürlichen Substrates, die dazu führt, daß verschiedene Phosphodiesterbindungen in unterschiedlichen Sequenz- und Strukturumgebungen kompetitiv gespalten werden. Daher können für solche Substrate lediglich apparente Reaktionsgeschwindigkeiten und kinetische Größen bestimmt werden. Für bestimmte Fragestellungen ist es daher günstig, kurze Substrate wie das für die *Serratia* Nuklease oft verwendete Dodekamer  $d(A_5GCT_5)_2$  oder Pentahomonukleotide einzusetzen, bei denen es eine stark bevorzugte Spaltstelle gibt (Friedhoff, 1995).

Nachdem Penta- und Tetranukleotide lange Zeit als die kürzesten spaltbaren Substrate der *Serratia* Nuklease angesehen wurden (Nestle & Roberts, 1969b; Friedhoff *et al.*, 1996a), wurde in dieser Arbeit die synthetische Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn) als ein neues Minimalsubstrat dieses Enzyms etabliert (Kap. 3.3). Mit Hilfe der Absorptionsänderung von Licht der Wellenlänge 400 nm während der Hydrolyse und der Kombination aus Phosphatase- und radioaktiver Markierungsreaktion konnte im Vergleich mit dem bekannten Spaltmodus für DNase I (Liao, 1975) gezeigt werden, daß die *Serratia* Nuklease die Spaltung dieses Substrates an der 5'-Seite katalysiert, wobei *p*-Nitrophenol sowie Desoxythymidin-3'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat entsteht (s. Kap. 3.3.1). An der 3'-Position wird nicht gespalten. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Spaltexperimente an kurzen Oligonukleotidsubstraten, bei denen herausgestellt worden war, daß das Vorhandensein eines Phosphates 3' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung für eine effektive Katalyse essentiell ist (Friedhoff *et al.*, 1996a). Dies dürfte auch der Grund dafür sein, daß die ebenfalls synthetische Substanz Desoxythymidin-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat von der *Serratia* Nuklease nicht gespalten wird, da auch hier ein Phosphat 3' von der zu spaltenden Bindung fehlt.

Unter Verwendung von npdTpn können enzymologische und kinetische Untersuchungen an einem definierten System durchgeführt werden, bei dem aus einem Substrat ein Produkt entsteht. Ein weiterer Vorteil des Einsatzes von npdTpn in einem Spaltassay ist der direkte Zusammenhang zwischen dem Spaltereignis und dem beobachtbaren hyperchromen Signal, was beispielsweise bei dem Hyperchromizitäts-Assay nicht gegeben ist. Hier besteht keine lineare Beziehung zwischen Spaltung und Signaländerung, da eine solche Änderung lediglich indirekt durch den Verlust von *stacking*-Wechselwirkungen hervorgerufen wird. Weil diese Abnahme von *stacking*-Interaktionen, die beim Übergang von doppelsträngigen zu einzelsträngigen Nukleinsäuren vorkommt, auch erst bei Produktlängen unter 10 Nukleotiden in Erscheinung tritt,

beobachtet man bei langen Nukleinsäuresubstraten das Phänomen der *lag*-Phase, bei der trotz stattfindender Spaltungen keine Signaländerung detektiert werden kann. Eine solche *lag*-Phase tritt bei der Spaltung kurzer Substrate nicht auf.

Ein Nachteil des Spaltassays mit Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat ist die geringe Aktivität, mit der dieses Substrat von der *Serratia* Nuklease umgesetzt wird: Im Vergleich zu hochmolekularer DNA wird es mit einer  $10^6$  mal geringeren Geschwindigkeit gespalten (Kap. 3.3.2), weshalb entsprechend hohe Substrat- und Enzymkonzentrationen eingesetzt werden müssen, um ein gutes Meßsignal zu erhalten. Da die Synthese von npdTpn relativ aufwendig ist (Franke, 1998), wird ein Assay mit diesem Minimalsubstrat für einige Fragestellungen sinnvoll sein, bei vielen kinetischen Untersuchungen jedoch den Hyperchromizitäts-Assay nicht ersetzen können.

Die in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Experimente mit verschiedenen Varianten der *Serratia* Nuklease (Kap. 3.1.2) haben gezeigt, daß die überwiegende Anzahl der Mutationen keinen Einfluß auf die Spaltung des kurzen artifiziellen Substrates npdTpn haben, da es von diesen Varianten mit Wildtyp-Aktivität umgesetzt wird. Lediglich ein Austausch der für die Katalyse absolut essentiellen Aminosäuren des aktiven Zentrums, His89 und Asn119, führen zu Enzymvarianten mit keiner oder einer nur geringen Aktivität gegenüber npdTpn. Viele andere Mutanten wie R57A oder R87A, die gegenüber DNA eine drastisch reduzierte Aktivität aufweisen, setzen Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat mit einer Aktivität vergleichbar der des Wildtyps um. So ist, neben der Analyse von CD-Spektren, mit diesem Substrat eine weitere Möglichkeit gegeben, die strukturelle Integrität einer neu generierten Enzymvariante zu untersuchen: Zeigt eine Mutante im Hyperchromizitäts-Assay gegenüber hochmolekularer DNA eine reduzierte Aktivität, so weist eine Spaltung von npdTpn darauf hin, daß zumindest das aktive Zentrum in seinen wichtigsten Komponenten intakt ist. Für eine möglicherweise reduzierte Aktivität ist somit nicht ein Defekt in der Proteinstruktur verantwortlich, sondern möglicherweise eine Defizienz in der Bindung o.ä. In ähnlicher Weise wurde das Substrat npdTpn auch eingesetzt, um die Integrität des aktiven Zentrums von Mutanten der DNase I zu untersuchen (Doherty *et al.*, 1995).

#### 4.2.2.1 Die Spaltung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat gibt

##### Hinweise auf den Katalysemechanismus der *Serratia* Nuklease

Nach jahrelanger kontroverser Diskussion ist mittlerweile die Rolle des für die Aktivität der *Serratia* Nuklease essentiellen Histidin 89 als allgemeine Base zur Aktivierung des anschließend als Nukleophil dienenden Wassermoleküls überwiegend akzeptiert. Gestützt wird dieses Modell durch zahlreiche Mutagenesestudien und kinetische Untersuchungen (Friedhoff *et al.*, 1994b, 1996b). So läßt beispielsweise der Vergleich der pH-Profile der Wildtyp-Nuklease sowie einiger Mutanten den Schluß zu, daß His89 unprotoniert vorliegen muß, um die Katalyse zu unterstützen (Friedhoff *et al.*, 1996b). In einem alternativen, jedoch wenig favorisierten Modell fungiert His89 als allgemeine Säure und Glu127 als allgemeine Base (Miller *et al.*, 1994; Antosiewicz *et al.*, 1997; Lunin *et al.*, 1997), was jedoch aufgrund der relativ hohen Restaktivität bei Fehlen dieser Aminosäuren unwahrscheinlich ist.

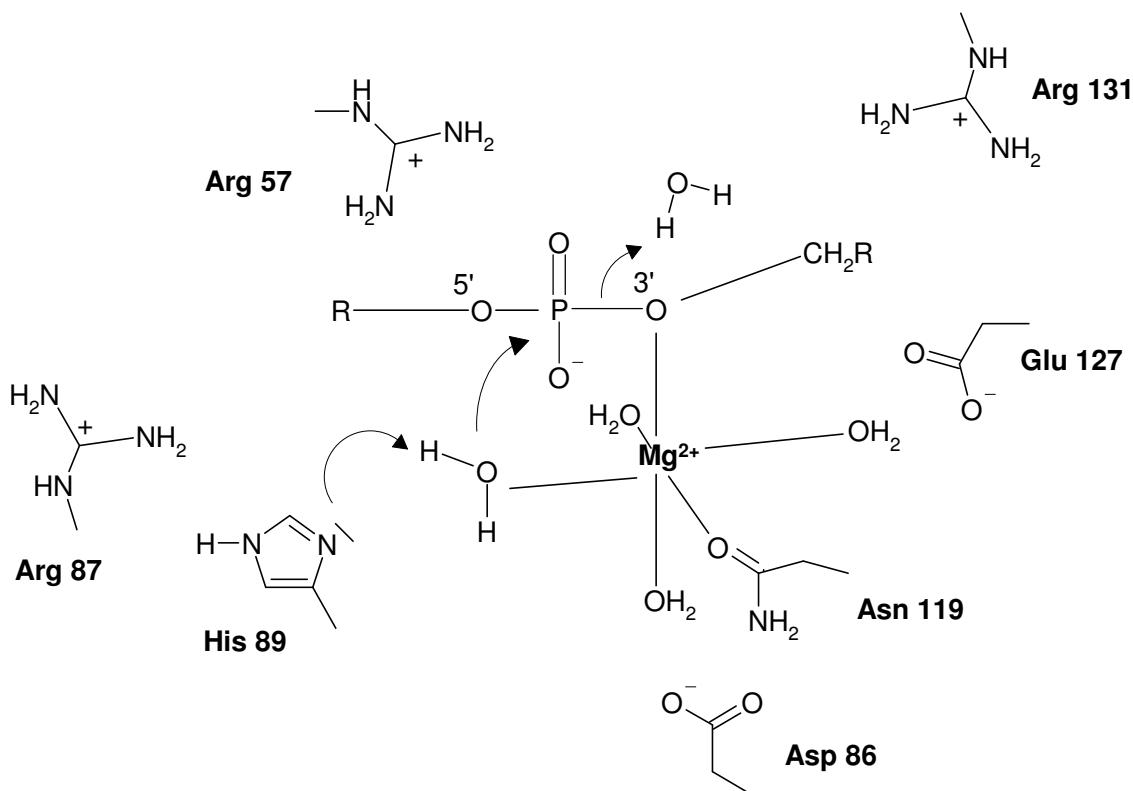
Aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Untersuchungen der Spaltung des künstlichen Substrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat kann eine Rolle des Histidin 89 als allgemeine Säure weitgehend ausgeschlossen werden: Wegen des niedrigen  $pK_a$ -Wertes der konjugierten Säure der *p*-Nitrophenolat-Abgangsgruppe von 7.14 (Fickling *et al.*, 1959) ist, im Gegensatz zur Spaltung von DNA oder RNA, deren Abgangsgruppen einen  $pK_a$ -Wert von etwa 16 besitzen, eine allgemeine Säure bei der Spaltung von npdTpn entbehrlich. Würde dem Histidin 89 bei der Katalyse die Rolle der allgemeinen Säure zukommen, so dürfte ein Austausch dieser Aminosäure gegen ein Alanin bei der Spaltung des Minimalsubstrates nicht zu einer so drastischen Reduzierung der Aktivität führen, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde (s. Kap. 3.1.2).

Umgekehrt zeigt die durch den Austausch der Aminosäure Glu127 gegen Alanin nicht beeinträchtigte Aktivität des Enzyms gegenüber Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat, daß dieser Aminosäurerest nicht als allgemeine Base fungieren kann.

In ähnlicher Weise wurde für die Bovine Ribonuklease A analysiert, welches der beiden im aktiven Zentrum sich befindenden Histidine während der Katalysereaktion als allgemeine Base bzw. allgemeine Säure fungiert: Die Mutante H119A spaltete in diesen Untersuchungen die Verbindung Uridin-3'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat mit Wildtyp-Aktivität in *p*-Nitrophenol und Uridinphosphat (Thompson & Raines, 1994); das Histidin ist also an dieser Stelle für die Hydrolyse dieser Verbindung abkömmlich. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Aminosäure

His119 in diesem Enzym nicht als allgemeine Base, sondern vielmehr als allgemeine Säure agiert.

Für den Mechanismus der Phosphodiestererspaltung durch die *Serratia* Nuklease ergibt sich somit folgendes Modell (**Abb. 4-2**): His 89 abstrahiert als allgemeine Base ein Proton eines Wassermoleküls und aktiviert es. Dabei kann es sich um ein freies Wassermolekül handeln oder um eines aus der Hydrathülle des Magnesiumions. Das auf diese Weise entstehende Hydroxyl-Ion greift als Nukleophil die Phosphatgruppe eines Substrates an, so daß ein pentakovalenter Übergangszustand entsteht. Dieser wird wahrscheinlich durch das als Cofaktor dienende  $Mg^{2+}$ -Ion stabilisiert. Letzteres wird oktaedrisch umgeben von 5 Wassermolekülen und der Seitenkette des Asn119 (Miller *et al.*, 1999). Die zunächst als Metallionen-Liganden favorisierten sauren Aminosäuren Asp86 und Glu127 sind dagegen lediglich indirekt über Asn119 bzw. ein Wassermolekül an der Magnesiumbindung beteiligt (Miller *et al.*, 1999).



**Abb. 4-2:** Möglicher Katalysemechanismus der Substratspaltung durch die *Serratia* Nuklease (verändert nach Miller *et al.*, 1999).

Auch der basischen Aminosäure Arg57 wird eine Beteiligung an der Stabilisierung des Übergangszustandes zugeschrieben, während Arg87 und Arg131 durch einen Kontakt mit den Phosphatgruppen 3' bzw. 5' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung maßgeblich an der Bindung eines Substrates beteiligt sind (Friedhoff *et al.*, 1996b) (s. Kap. 4.3). Wie die Protonierung der Abgangsgruppe verwirklicht wird, ist zur Zeit noch unbekannt; in Frage dafür kommt ein durch Glu127 aktiviertes Wassermolekül des Lösungsmittels oder auch eines, das sich in der Hydratationssphäre des  $Mg^{2+}$  befindet, wie es für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *EcoRV* angenommen wird (Jeltsch *et al.*, 1993). Alternativ hierzu kann auch die Assoziation des Metallions an die negativ geladene Abgangsgruppe deren Ablösung erleichtern, wie es für die 3'→5' Exonuklease der Klenow-Polymerase diskutiert wurde (Beese & Steitz, 1991).

### 4.3 Die Substratbindungsstelle der *Serratia* Nuklease

Grundsätzlich gibt es mehrere Möglichkeiten der Bindung eines Substrates an ein Protein: Für nukleinsäurebindende Proteine wie Nukleasen ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen den positiv geladenen Seitenketten der Aminosäuren Arginin und Lysin und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat von besonderer Bedeutung. Kontakte dieser Art sind häufig beim Aufbau multipler Bindungsstellen für das Substrat beteiligt (als Beispiel siehe RNase A, Kap. 4.3.2.1). Ferner können die Seitenketten von Asparaginen, Serinen und Threoninen bzw. die Peptidgruppen anderer Aminosäuren über Wasserstoffbrückenbindungen die Phosphate kontaktieren. Als Beispiele hierzu seien die unspezifische DNase I (Evans *et al.*, 1999) und die Restriktionsendonuklease *EcoRV* (Wenz *et al.*, 1996) genannt.

Neben diesen, *indirect read out* genannten Kontakten zum Phosphatrückgrat haben, insbesondere bei spezifischen Enzymen wie den Restriktionsendonukleasen mit definierten Erkennungssequenzen, auch die Kontakte zu den Basen einer Nukleinsäure (*direct read out*) eine große Bedeutung für die Bindung eines Substrates. Über die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und die sterische Begrenzung einer Basenbindungsstelle kann eine ausgeprägte Spezifität für bestimmte Basen bzw. für entweder Purine oder Pyrimidine verwirklicht werden. Diese Art der Kontakte sind bei unspezifischen Nukleasen wie der *Serratia* Nuklease nicht zu erwarten.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, über die Interkalation von aromatischen Aminosäureseitenketten zwischen die Basen einer Nukleinsäure (*stacking*) ein Substrat zu binden. Dies ist beispielsweise bei der Ribonuklease T<sub>1</sub> verwirklicht, bei der die Seitenketten zweier Tyrosine über ein „*sandwich-stacking*“ ein Guanin des Substrates binden (Steyaert, 1997). Bei der verwandten Barnase interkaliert die Erkennungsbase Guanin zwischen die aromatischen Ringsysteme eines Phenylalanin- und eines Tyrosinrestes (Buckle & Fersht, 1994). Bei der unspezifischen Bovinen Desoxyribonuklease I ragt neben einem Arginin eine Tyrosinseitenkette in die kleine Grube einer gebundenen DNA hinein und bildet hier eine ungewöhnliche *stacking*-Wechselwirkung mit einer Desoxyribose aus (Suck & Oefner, 1986). Allgemein ist die Bindung von Substraten über die Ausbildung von *stacking*-Interaktionen besonders ausgeprägt bei vielen RNA-bindenden Proteinen wie z.B. bei dem U1A-*splicing* Protein (Oubridge *et al.*, 1994).

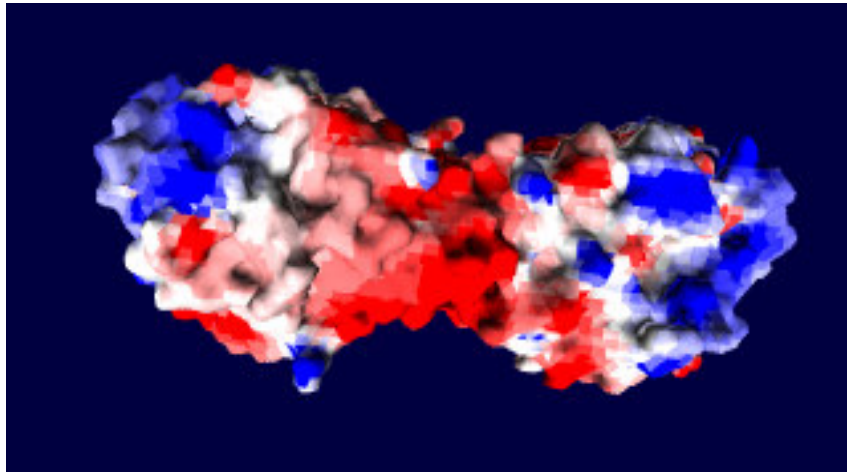
In dieser Arbeit wurden beide Möglichkeiten der Substratbindung, über elektrostatische und über *stacking*-Wechselwirkungen, näher untersucht.

### 4.3.1 An der Substratbindung beteiligte Aminosäuren der *Serratia* Nuklease

Die Charakterisierung der Substratbindungsstelle der *Serratia* Nuklease wird dadurch erschwert, daß es sich bei diesem Enzym um eine unspezifische Nuklease handelt, die keine klare Erkennungssequenz benötigt, sondern unabhängig von der Art des Zuckerrestes sowie der Basen nahezu jede Nukleinsäure als Substrat akzeptiert und hydrolysiert. Hinzu kommt die große Umsatzgeschwindigkeit, die die einer diffusionskontrollierten Reaktion ( $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ ) (Fersht, 1985) nahezu erreicht.

Dies sind Gründe für die Schwierigkeit, Bedingungen zu finden, unter denen die Nuklease zusammen mit einem Substrat kristallisiert, ohne daß Spaltung stattfindet. Infolgedessen liegen bis heute von der *Serratia* Nuklease lediglich Daten der Kristallstruktur des Apoenzyms (Miller *et al.*, 1991, 1994; Miller & Krause, 1996; Lunin *et al.*, 1997) bzw. des Enzyms mit dem Cofaktor (Miller *et al.*, 1999) vor, jedoch keine Struktur eines Cokristalls, aus der Kontakte zwischen Protein und Substrat direkt erschlossen werden könnten. Ausgangspunkt für diese Arbeit konnte daher lediglich die Struktur des Apoenzyms sein.

Betrachtet man die Oberflächenladung der Nuklease, so fällt ein Bereich positiver Ladung auf, der sich entlang einer Grube über das Protein erstreckt (**Abb. 4-3**).



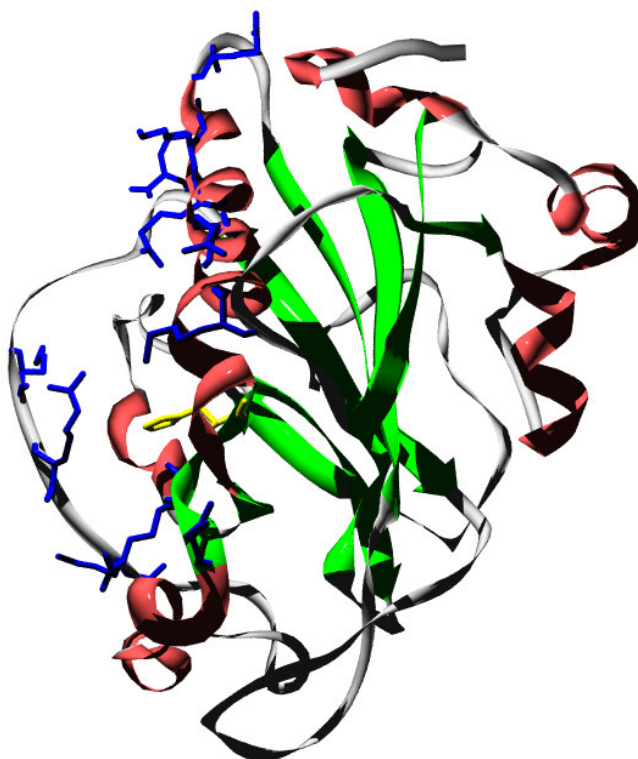
**Abb. 4-3:** Elektrostatistisches Oberflächenpotential der Nuklease aus *Serratia marcescens*. Dargestellt ist das Enzym in seiner dimeren Form. Rote Bereiche zeigen negative Ladungen an, positiv geladene Bereiche sind blau gefärbt. Die Berechnung der Oberflächenladung beruht auf den Strukturdaten der Nuklease (Miller & Krause, 1996) und erfolgte mit Hilfe des Swiss-PdbViewers v3.5.

Diese wird von insgesamt 11 basischen Aminosäuren flankiert und wurde als vermutliche Substratbindungsregion angesehen, die mit einer Nukleinsäure nicht-kovalente, ionische Wechselwirkungen eingehen könnte (Miller *et al.*, 1994) (**Abb. 4-4**). Wird in diese Bindungstasche eine Desoxyribonukleinsäure in B-DNA-Form hineinmodelliert, so ergibt sich eine mögliche Bedeckungslänge von etwa 12 Nukleotiden (Miller *et al.*, 1994). Die 6 Lysine und 5 Arginine dieser Region sind z.T. in der Familie der unspezifischen Nukleasen des *Serratia*-Typs konserviert (Friedhoff *et al.*, 1996b; s. **Abb. 4-7**). Neben den Aminosäuren Arg57, Arg87 und Arg131, die schon in früheren Arbeiten untersucht worden waren (Friedhoff 1995, Friedhoff *et al.*, 1996b), wurden diese basischen Reste hinsichtlich ihrer möglichen Beteiligung an der Substratbindung näher charakterisiert.

Bei der Etablierung eines Bindungs-Assays ergibt sich eine Schwierigkeit aus der fehlenden Spezifität der *Serratia* Nuklease, weil bei unspezifischen Enzymen lediglich inaktive Enzymvarianten bzw. artifizielle Substrate eingesetzt werden können, die von der Nuklease nicht hydrolysiert werden (Friedhoff *et al.*, 1994b, Kolmes, 1995). Da dies jedoch artifizielle



Bedingungen sind, die der natürlichen Situation keineswegs entsprechen, wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung von Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sein können, die Methode der ortsgerichteten Mutagenese gewählt, bei der jede der elf basischen Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht und die so generierten Mutanten einer anschließenden kinetischen Analyse unterzogen wurden.



**Abb. 4-4:** Darstellung einer Untereinheit der *Serratia* Nuklease mit  $\alpha$ -Helices (rot),  $\beta$ -Faltblättern (grün) und *loops* (grau). Auf der linken Seite sind die 11 basischen Aminosäuren, die eine Grube an der Oberfläche des Enzyms flankieren und die vermutliche Substratbindungsstelle bilden, blau markiert. Zur Orientierung ist das Histidin 89 des aktiven Zentrums gelb hervorgehoben.

Alle Varianten konnten als rekombinante Proteine sauber aufgereinigt werden und weisen CD-Spektren auf, die sich nicht oder nur geringfügig von dem der Wildtyp-Nuklease unterscheiden (Kap. 3.1). Dies und die Tatsache, daß alle neu generierten Bindungsmutanten das artifizielle Minimalsubstrat Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat mit Wildtyp-Aktivität

umsetzen (Kap. 3.2.1.2), zeigt, daß die Proteine in großen Teilen korrekt gefaltet vorliegen und das aktive Zentrum intakt ist.

#### 4.3.1.1 $K_M$ -Mutanten

Zur Beurteilung einer möglichen Beteiligung der jeweiligen Aminosäurereste an der Substratbindung wurden zunächst die kinetischen Parameter  $k_{cat}$  und  $K_M$  der neu generierten Nuklease-Varianten bestimmt (Kap. 3.2.1.1), da die Michaelis-Konstante  $K_M$  unter Michaelis-Menten-Bedingungen ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Substrat ist (Fersht, 1985). Die Bedeutung der Arginine an der Position 57, 87 und 131 ist schon in früheren Arbeiten herausgestellt worden (Friedhoff 1995, Friedhoff *et al.*, 1996b): Während die Funktion der Aminosäure Arg57, deren Austausch gegen Alanin zu einer Mutante mit stark reduziertem  $k_{cat}$ -Wert führt, eher in der Stabilisierung des Übergangszustandes während der Hydrolysereaktion bestehen könnte, wurde für die Aminosäuren Arg87 und Arg131 eine klare Beteiligung an der Substratbindung postuliert. Deren Austausch durch ein neutrales Alanin führt zu Enzymvarianten mit deutlich erhöhten  $K_M$ -Werten von 111 bzw. 35 relativ zum Wildtyp, während ein konservativer Austausch des Arg87 gegen ein Lysin, bei dem die positive Ladung erhalten bleibt, die Aktivität lediglich um die Hälfte reduziert (Friedhoff *et al.*, 1996b).

Neben diesen wurden in dieser Arbeit die Aminosäuren Lys60, Lys132 und in geringerem Maße Lys55, Arg125 und Lys196 als an der Substratbindung beteiligte Reste herausgestellt, da die Wegnahme der positiven Ladungen an diesen Stellen zu Enzymvarianten führt, die offensichtlich eine geringere Substrataffinität besitzen. Dabei sind die Effekte eines Aminosäureaustausches an einer einzelnen Position mit einer 2-10fachen Erhöhung des  $K_M$ -Wertes relativ zum Wildtypenzym nicht sehr groß. Dies ist jedoch bei einem unspezifischen Enzym auch nicht zu erwarten, da es offensichtlich neben der Substratbindung im aktiven Zentrum weitere Kontaktpositionen gibt, deren Bindungsbeiträge insgesamt in additiver Art zu einer effektiven Wechselwirkung zwischen Enzym und Substrat führen.

#### 4.3.1.2 Makroskopischer Spaltmechanismus der Bindungsmutanten

Eine Relevanz der genannten Aminosäuren für die Substratbindung wird auch in der veränderten Verteilung der Produktspezies bei der Spaltung überspiralisierter Plasmid-DNA deutlich (Kap. 3.2.2): Der größte Effekt trat hierbei wiederum bei der stärksten Bindungsmutante R87A

auf, bei der während des Reaktionsverlaufs bis zu 60 % mehr offen zirkuläres (*oc*) Produkt gebildet wurde als lineare (*lin*) DNA. Dies steht in deutlichem Gegensatz zu der Hydrolysereaktion des Wildtyp-Enzyms, bei der *oc*- und *lin*-Produkt etwa gleich stark populiert sind. Eine ähnliche, wenn auch weniger ausgeprägte Akkumulation von *oc*-Plasmid tritt auch während der Reaktion mit den Bindungsmutanten R131A, K60A und K196A auf, wohingegen mit der Mutante H89N ein Beispiel für eine Variante einer Aminosäure aufgezeigt wurde, die nicht an der Bindung des Substrates, sondern an der Katalysereaktion selbst beteiligt ist, und die im Plasmid-Spaltassay ein dem Wildtyp entsprechendes Verhalten aufweist.

Die verstärkte Akkumulation offen zirkulärer Plasmid-DNA korreliert also mit der geringeren Substrataffinität der untersuchten Bindungsmutanten. Der Wildtyp der *Serratia* Nuklease degradiert überspiralisierte Plasmid-DNA, indem statistisch verteilt Einzelstrangbrüche (*nicks*) eingefügt werden, die jedoch aufgrund der relativ festen Bindung des Substrates und aufgrund des dimeren Charakters der Nuklease, der ein prozessives *nicking* begünstigt, schnell zu Doppelstrangbrüchen und somit zur Linearisierung der DNA führen (Franke *et al.*, 1999b). Ein solcher Mechanismus wird „diplotomisch“ genannt und ist charakteristisch für viele unspezifische Nukleasen (Boyer, 1971; Schumaker *et al.*, 1960). Ist die Bindung zwischen Nuklease und Substrat durch das Fehlen einer basischen Aminosäure in einer Bindungsstelle geschwächt, so werden aufgrund einer kürzeren Verweildauer der Mutante an ihrem Substrat bevorzugt Einzelstrangbrüche eingefügt, was eine Anhäufung von *oc*-DNA zur Folge hat („haplotomischer“ Mechanismus). Erst im weiteren Verlauf der Reaktion kommt es durch eine Reihe weiterer Einzelstrangspaltungen zu einer Linearisierung und zum weiteren Abbau der DNA.

Analoge Experimente - wenn auch in umgekehrter Richtung - wurden für die ebenfalls unspezifische humane DNase I durchgeführt (Pan & Lazarus, 1997, 1998). Hier wurde durch die Einführung von insgesamt 6 basischen Aminosäuren im Enzym/Substrat-Interface eine hyperaktive Nuklease-Variante geschaffen, die, vorwiegend aufgrund eines stark reduzierten  $K_M$ -Wertes, unter bestimmten Bedingungen eine gegenüber dem Wildtyp mehr als 10 000fach erhöhte Aktivität aufwies. Im Plasmid-Spaltassay zeigte diese Mutante ein verändertes Verhalten gegenüber der Wildtyp-Nuklease, so daß sehr viel schneller und in größerem Maße lineares Produkt gebildet wurde, was auf eine durch die Einführung positiver Ladungen deutlich verbesserte Affinität des Enzyms gegenüber hochmolekularer DNA und eine dadurch erzielte größere Prozessivität zurückgeführt wurde.

Ein Zusammenhang zwischen der Affinität der Nuklease zu einem Substrat und den Spalteigenschaften gegenüber hochmolekularer DNA konnte zuvor schon dadurch gezeigt werden, daß nach der Zugabe von Salz eine durch einen *Crosslink* vernetzte dimere Variante der *Serratia* Nuklease ebenso einem haplotomischen Mechanismus der Plasmidspaltung folgt wie eine obligat monomere Variante des Enzyms (Franke *et al.*, 1999b). Demgegenüber entspricht der Spaltmechanismus des Nuklease-Wildtyps, der in seiner Bindung nicht beeinträchtigt wird, eher einem diplotomischen Typ.

#### 4.3.1.3 Ionische Wechselwirkungen als Grundlage der Substratbindung

Ebenso wie in dieser Arbeit für die *Serratia* Nuklease wurde bei den oben beschriebenen DNase I-Varianten die Salzabhängigkeit untersucht (Pan & Lazarus, 1997). Dabei ergab sich, daß die für die Aktivität optimale Salzkonzentration mit zunehmender Anzahl eingefügter positiver Aminosäurereste ansteigt. Der Grund hierfür ist, daß eine zu starke Bindung zwischen Enzym und Substrat eine langsamere Dissoziation des Produktes und somit eine verminderte Aktivität zur Folge haben kann. Dies kann durch eine erhöhte Ionenstärke ausgeglichen werden. Ein umgekehrter Zusammenhang ergibt sich für die Salzabhängigkeit der untersuchten Varianten der *Serratia* Nuklease (Kap. 3.2.3): Die  $K_M$ -Mutanten R87A, R131A, K60A, K132A und K196A zeigen schon bei geringen Salzkonzentrationen einen starken Abfall ihrer Aktivität, während die Wildtyp-Nuklease bei 0 bis 50 mM NaCl ihre maximale Aktivität entfaltet und erst bei höherer Ionenstärke schwächer wird. Wiederum ist der Effekt am stärksten ausgeprägt bei der Mutante R87A. Der Grund für diese stärkere Sensibilität der generierten Bindungsmutanten gegenüber Salz ist wiederum der ionische Charakter der Wechselwirkung zwischen Protein und Substrat. Ist diese Wechselwirkung durch den Verlust einer positiven Ladung in der Substratbindungsstelle gestört, so wirkt sich die Zugabe von Salzionen sehr viel negativer aus als bei der intakten Bindungsregion des Wildtyp-Enzyms.

Die beschriebenen Experimente dokumentieren die Bedeutung des elektrostatischen Potentials für die Interaktionen zwischen Makromolekülen, das bei Nukleasen hauptsächlich durch positive Aminosäuren in der Substratbindungsstelle aufgebaut wird (Honig & Nicholls, 1995).

#### 4.3.1.4 Die Bedeutung der aromatischen Aminosäuren Tyr76 und Trp123 für die Substratbindung

Da die Aminosäuren Tyr76 und Trp123 in der Familie der unspezifischen Nukleasen des *Serratia*-Typs streng konserviert vorliegen (s.u. **Abb. 4-7**) und sich außerdem in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums befinden, waren diese bereits Gegenstand früherer Mutagenesestudien und kinetischer Untersuchungen. Dabei führte der Austausch des Tyr76 gegen Phenylalanin zu einer Nuklease-Variante mit nur geringfügig reduzierter Aktivität (Friedhoff *et al.*, 1996b), während das Enzym durch einen Austausch gegen Alanin nahezu vollständig inaktiviert wird (Meiss *et al.*, 1999). Dies verdeutlicht die Bedeutung des aromatischen Ringes dieser Aminosäure, die entweder eine wichtige strukturelle Aufgabe hat oder an der Substratbindung beteiligt sein könnte. Die Mutante W123A wies in *steady state*-Kinetiken einen stark erhöhten  $K_M$ -Wert auf, während der konservative Austausch gegen Phenylalanin zu einer Nuklease-Variante mit Wildtyp-Aktivität und einem nur leicht erhöhten  $K_M$ -Wert führt (Meiss *et al.*, 1999). Diese Ergebnisse deuten auf eine mögliche Beteiligung der aromatischen Seitenkette dieses Tryptophanrestes an der Substratbindung hin. Eine Relevanz beider Aminosäurereste zeigt sich auch in der Unfähigkeit der jeweiligen Alanin-Mutanten, die Spaltung des artifiziellen Minimalsubstrates Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat zu katalysieren (Meiss *et al.*, 1999). Die Vermutung, die genannten aromatischen Aminosäuren könnten über direkte Wechselwirkungen mit dem Substrat für eine nachgewiesene Präferenz der *Serratia* Nuklease für bestimmte Substrate in A-Form verantwortlich sein, hatte sich in früheren Untersuchungen mit unterschiedlichen Substraten, die von den Alanin-Mutanten dieser Reste mit Wildtyp-Präferenz gespalten worden waren, nicht bestätigt (Meiss *et al.*, 1999).

Beide Aminosäurereste könnten jedoch über *stacking*-Wechselwirkungen Interaktionen mit den Basen eines gebundenen Substrates eingehen. Diese Möglichkeit wurde im Rahmen dieser Arbeit durch Spaltexperimente mit Oligonukleotiden untersucht, die jeweils eine abasische Position besitzen (Kap. 3.3).

Dabei wurde ein unmodifiziertes Pentamer sowie ein Oligonukleotid, welches in der dritten Position eine abasische *site* aufweist, an der zweiten Phosphodiesterbindung stark bevorzugt gespalten, während bei einer Verschiebung der abasischen Position in 5'-Richtung die dritte Phosphodiesterbindung bevorzugt wurde. Ähnliches wurde bereits in früheren Untersuchungen bei der Spaltung von Posphorothioaten beobachtet, wo eine Veränderung an der zu spaltenden Bindung bzw. am 5' benachbarten Phosphat zu einer Verschiebung der bevorzugten

Spaltposition nach rechts führte (Friedhoff *et al.*, 1996a). Dies verdeutlicht die Bedeutung des Phosphatrestes und, wie das Experiment mit abasischen Substraten in dieser Arbeit zeigt, auch die Bedeutung der Base, die sich 5' von der zu spaltenden Bindung befindet, für eine effektive Katalysereaktion.

Die Ergebnisse der Spaltexperimente mit den abasischen Pentameren deuten auf eine mögliche Beteiligung des Aminosäurerestes Trp123 an der Erkennung einer Base 5' von der zu spaltenden Bindung hin: Wird diese Aminosäure gegen ein Alanin ausgetauscht, so führt dies zu einem deutlich verringerten Umsatz eines Substrates, das 5' von der Spaltstelle eine fehlende Base aufweist, während eine abasische *site* in 3'-Richtung keine Auswirkungen hat. Die aromatische Seitenkette des Trp123 könnte demnach, möglicherweise durch *stacking*-Wechselwirkungen, mit einer Base des Substrates interagieren und somit an der Bindung beteiligt sein. Ein solcher Kontakt wäre unabhängig von der Art der Base, was dem unspezifischen Charakter der Nuklease entspräche.

Die Mutante Y76A setzt beide eingesetzten abasischen Pentamer-Varianten mit der gleichen reduzierten Geschwindigkeit um, was auf eine mögliche Interaktion dieser Aminosäure an zentraler Position mit der zu spaltenden Phosphodiesterbindung schließen läßt. Andererseits ist jedoch auch eine strukturelle Funktion des Tyrosins innerhalb des Netzwerkes, das das aktive Zentrum der *Serratia* Nuklease aufbaut, nicht auszuschließen.

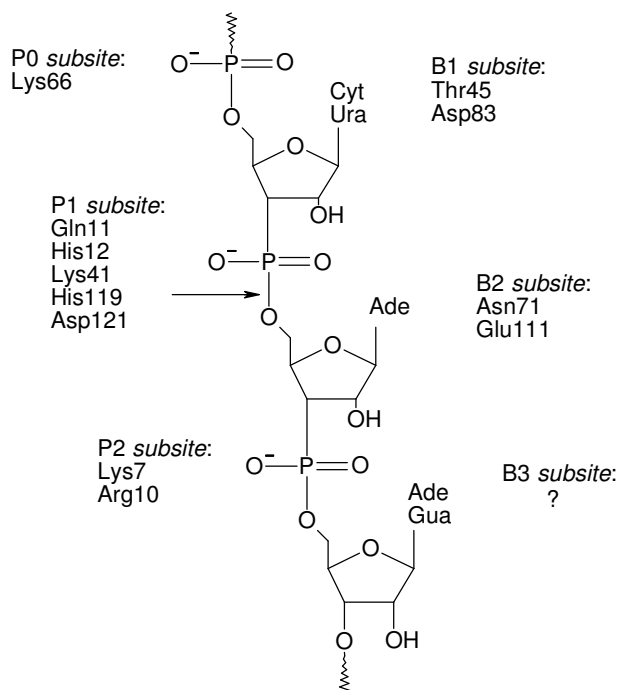
Die für die abasischen Pentamere beschriebenen Effekte ließen sich bei den untersuchten Dodekameren mit jeweils einer abasischen Position nicht beobachten. Dies liegt offenbar an der größeren Zahl alternativer Phosphodiesterbindungen, die im Laufe der Reaktion gespalten werden können und die einen möglicherweise kleinen Effekt einer fehlenden Base auf die Gesamtgeschwindigkeit der Hydrolysereaktion überdecken.

### **4.3.2 Definition einzelner Bindungsstellen in der Bindungsregion der *Serratia* Nuklease**

#### **4.3.2.1 RNase A als Beispiel eines Enzyms mit multiplen Substratbindungsstellen**

Bei der bovinen pankreatischen Ribonuklease A (RNase A), einem Enzym, das RNA an der 3'-Seite von Pyrimidinen hydrolysiert, sind mit Hilfe zahlreicher Mutagenesestudien insgesamt 12

Aminosäurereste charakterisiert worden, die an der Substratbindung und/oder an der Katalyse beteiligt sind (Raines, 1998). Diese sind bestimmten Basen- bzw. Phosphatgruppen-Bindungsstellen (B bzw. P *subsites*) (Pares *et al.*, 1991; Nogues *et al.*, 1995) zugeordnet worden, deren Anordnung in **Abb. 4-5** gezeigt ist.



**Abb. 4-5:** Schematische Darstellung der Bindung einer RNA an Ribonuklease A. Die zu spaltende Phosphodiesterbindung ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. B und P *subsites* bezeichnen die Basen- bzw. Phosphatgruppen-Bindungsstellen (nach Raines, 1998).

Die Bindungsstellen B1, B2 und B3, die von unterschiedlichen Aminosäuren gebildet werden, interagieren mit den Basen eines gebundenen Substrates und bestimmen durch die Ausbildung definierter Wasserstoffbrücken und durch sterische Anforderungen die Spezifität bzw. Präferenz der einzelnen Bindungsstellen für spezielle Basen. Demgegenüber werden die Phosphatbindungsstellen P0, P1 und P2 überwiegend von den basischen Aminosäuren Lysin und Arginin aufgebaut, die mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäure über elektrostatische Wechselwirkungen interagieren. Die P1 *subsite*, die dem aktiven Zentrum des Enzyms entspricht, umfaßt weiterhin die Reste Gln11, His12, His119 und Asp121. Bei der

RNase A erstrecken sich also die Interaktionen zwischen Enzym und Substrat weit über das aktive Zentrum hinaus, was einerseits eine stärkere Bindung, andererseits jedoch auch eine deutlichere Spezifität gegenüber dem Substrat ermöglicht.

Eine ähnliche Zuordnung verschiedener Aminosäuren zu bestimmten Basen- und Phosphatgruppen-Bindungsstellen wurde, hauptsächlich aufgrund von Mutagenesestudien und anschließenden kinetischen Untersuchungen, für eine Vielzahl unspezifischer und spezifischer Nukleasen vorgenommen. Als Beispiele seien hier die ebenfalls einzelstrangspaltende, jedoch für Guanine spezifische Ribonuklease T1 (Steyaert, 1997), die hiermit verwandte Barnase (Buckle *et al.*, 1994) sowie die Restriktionsendonuklease *EcoRV* (Wenz *et al.*, 1996) genannt.

#### 4.3.2.2 Substratbindungsstellen der *Serratia* Nuklease

Spaltexperimente an unterschiedlich langen Substraten können bei einer unspezifischen Nuklease eine Möglichkeit bieten, die Position potentieller Substratbindungsstellen zu bestimmen. Dazu wird durch Mutation eine positive Interaktion zwischen Enzym und Nukleinsäure entfernt und der Effekt auf die Hydrolyse der verschiedenen Substrate untersucht. Hierbei wird eine Reihe von Substraten benötigt, welche möglichst nur eine definierte Spaltstelle besitzen, damit eine vergleichbare Bindung der Substrate im aktiven Zentrum der Nuklease selbst und an den unterschiedlich langen Flanken angenommen werden kann. Für die *Serratia* Nuklease bot sich die Reihe  $d(pA)_3$ ,  $d(pA)_4$  und  $d(pA)_5$  an, wobei das Trinukleotid aufgrund einer sehr geringen Spaltgeschwindigkeit nicht weiter untersucht wurde. Bei diesen Substraten besteht eine ausgeprägte Spaltpräferenz zwischen den Positionen 2 und 3 (Friedhoff *et al.*, 1996a). Bei einigen Mutanten wurde zusätzlich die Reihe  $d(A_nGCT_n)$  eingesetzt, wobei  $n$  für 2 bis 6 steht. Zu Beginn der Hydrolysereaktion werden diese Oligonukleotide präferentiell zwischen dem zentralen Guanin und Cytosin gespalten, in geringerem Maße auch zwischen den Basen A und G (Kolmes, 1995). Erst nach nahezu vollständiger Hydrolyse dieser Phosphodiesterbindungen werden im weiteren Verlauf der Reaktion kürzere Produkte gebildet. Bei diesen Substraten ist also keine absolut definierte spezifische Spaltstelle vorhanden, doch ist bei Betrachtung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktionen dennoch eine relative Aussage über die Hydrolysegeschwindigkeiten zulässig.

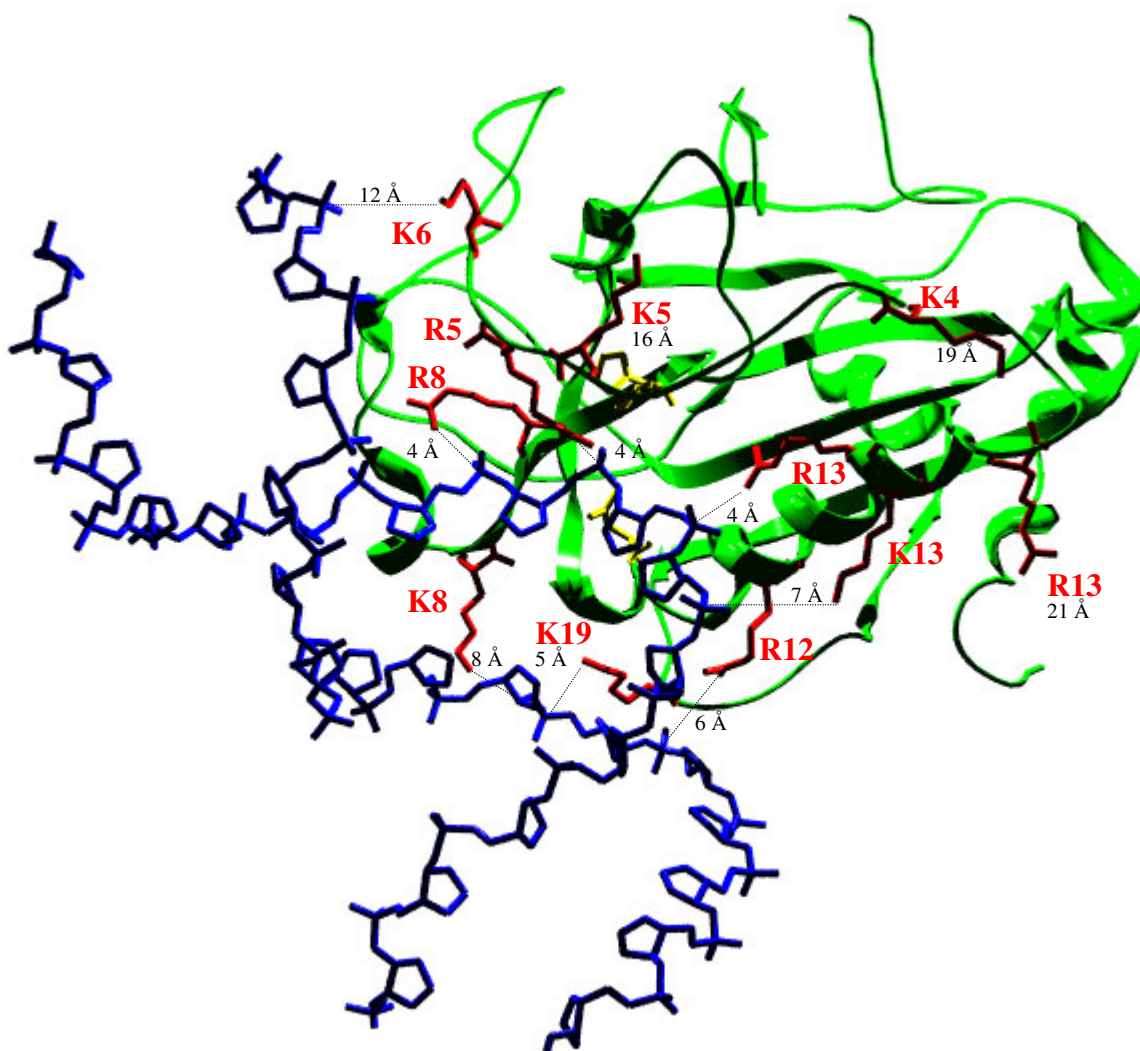
Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten idealerweise mit den Strukturdaten für die *Serratia* Nuklease verglichen werden. Obwohl bis heute keine Cokristallisation des Enzyms mit



einem Substrat gelungen ist und es also keine Strukturdaten für einen Komplex gibt, läßt sich dennoch die Tatsache nutzen, daß die aktiven Zentren der *Serratia* Nuklease und der *Homing*-Endonuklease I-*Ppo* I eine starke strukturelle Ähnlichkeit besitzen (Friedhoff *et al.*, 1999a) (s. Kap. 1.1.3) und von I-*Ppo* I die Cokristallstruktur aufgeklärt wurde (Flick *et al.*, 1997, 1998). Überlagert man die aktiven Zentren beider Enzyme, so kann man die Strukturdaten des Substrates der *Homing*-Endonuklease für die *Serratia* Nuklease übernehmen und erhält so ein Modell für die Bindung einer doppelsträngigen Nukleinsäure, das zumindest im Bereich des aktiven Zentrums durchaus ein realistisches Bild der tatsächlichen Protein/Substrat-Interaktionen aufzeichnen kann, da die an I-*Ppo* I gebundene DNA sich in einem solchen Modell nicht mit der Struktur der *Serratia* Nuklease überschneidet, sondern sich in das aktive Zentrum einfügt (**Abb. 4-6**) (Srivastava *et al.*, 1999). Gestützt wird das Modell durch die Tatsache, daß in der Kristallstruktur der I-*Ppo*I *Homing*-Endonuklease mit ihrem kognaten Substrat die DNA im aktiven Zentrum eine Konformation einnimmt, die in ihren Zucker- und Basenausrichtungen deutlich einer A-Form entspricht (Flick *et al.*, 1998), also eine Konformation, die auch von der *Serratia* Nuklease bevorzugt gebunden und gespalten wird (Meiss *et al.*, 1999).

Für die Nuklease-Varianten R57A, R87A und R131A ergab die Untersuchung der Spaltung kurzer Substrate sowie der Vergleich mit der Spaltgeschwindigkeit von einerseits hochmolekularer DNA und andererseits vom Minimalsubstrat Thymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat (npdTpn) (s. **Tab. 3-4**), daß letzteres von diesen drei Mutanten mit Wildtyp-Aktivität umgesetzt wird, die Spaltung längerer Substrate jedoch durch den Verlust eines dieser Arginine stark eingeschränkt bzw. sogar ganz verhindert wird. Dies bestätigt frühere Untersuchungen, die gezeigt hatten, daß die genannten Aminosäurereste Teil des aktiven Zentrums und für eine effektive Katalysereaktion essentiell sind (Friedhoff *et al.*, 1996). Die Umsetzung des Minimalsubstrates wird durch die Mutationen jedoch nicht beeinflusst, da bei diesem extrem kurzen Substrat mit nur zwei Phosphodiestergruppen die Bindung gegenüber der eigentlichen Katalyse eine untergeordnete Rolle spielt und lediglich Mutationen, die das essentielle Histidin 89 und Asparagin 119 betreffen, zu einer verminderten Umsetzung führen (s. Kap. 3.1.2).

Im Bindungsmodell der *Serratia* Nuklease (Abb. 4-6) weist Arg57 einen Abstand von etwa 4 Å zu der zu spaltenden Phosphodiesterbindung auf. Aufgrund früherer Mutagenesestudien, die die Variante R57A als sehr starke  $k_{\text{cat}}$ -Mutante herausgestellt hatten (Friedhoff *et al.*, 1996), wurde dieser Aminosäure die Funktion der Stabilisierung des Übergangszustandes zugeschrieben.



**Abb. 4-6:** Modell der Bindung einer DNA (blau) an die *Serratia* Nuklease (grün). Die 11 untersuchten basischen Aminosäuren (rot) sowie deren Abstand zum nächstgelegenen Phosphat sind dargestellt. Das Histidin 89 des aktiven Zentrums ist gelb hervorgehoben. Das Modell entstand, indem die aktiven Zentren der *Serratia* Nuklease und der *Homing*-Endonuklease I-PpoI überlagert wurden und die DNA der I-PpoI-Cokristallstruktur für die *Serratia*- Nuklease übernommen wurde.

R87A und R131A sind die Varianten mit den deutlichsten  $K_M$ -Effekten. Nach dem Bindungsmodell könnten die Aminosäureseitenketten dieser Aminosäuren mit einem Abstand von

etwa 4 Å einen Kontakt zu den Phosphatgruppen 3' bzw. 5' von der zu spaltenden Bindung ausbilden. Diese Nähe zum aktiven Zentrum sowie die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Plasmidspaltung und Salzabhängigkeit der Mutanten verdeutlichen die Bedeutung der positiven Ladung dieser beiden Aminosäuren für die Bindung eines Substrates. Für Arg87 wird dies auch dadurch bestätigt, daß ein konservativer Austausch des Arginins gegen ein Lysin zu einer Variante führt, deren Aktivität lediglich um 50 % eingeschränkt ist (Friedhoff *et al.*, 1996b). Die große Bedeutung des Arg87 spiegelt sich auch in der Tatsache wider, daß durch Untersuchungen mit Oligonukleotiden, die an einer Position Phosphorothioatgruppen enthalten, sowie mit Hilfe kurzer Substrate ermittelt wurde, daß die Phosphatgruppe 3' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung essentiell für eine effiziente Spaltung ist (Friedhoff, 1995; Friedhoff *et al.*, 1996a). Dieser Kontakt zwischen Arg87 und dem 3'-Phosphat scheint demnach für eine korrekte Positionierung einer Nukleinsäure und damit auch für eine effektive Katalyse unerlässlich zu sein.

Bei der  $K_M$ -Mutante K60A tritt der Übergang zwischen reduzierter Spaltgeschwindigkeit und Wildtyp-Aktivität erst bei einer Substratlänge von etwa 12 bis 14 Nukleotiden auf (Kap. 3.2.1.2). Im Modell (**Abb. 4-6**) kann diese Aminosäure mit einem Abstand von etwa 12 Å mit dem Phosphatrückgrat des DNA-Gegenstranges etwa 6 Nukleotide 3' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung in Kontakt treten. In diesem Bereich ist das Modell sicherlich sehr spekulativ, doch das Ergebnis der Spaltexperimente an kurzen Substraten läßt einen solchen Kontakt und die dargestellte Art der Substratbindung zumindest möglich erscheinen.

K132A als weitere Mutante mit  $K_M$ -Effekt spaltet längere Oligonukleotidsubstrate bis zu einer Länge von 6 Nukleotiden mit halbmaximaler Geschwindigkeit relativ zum Wildtyp, während bei der Hydrolyse kürzerer Substrate die Mutation an Bedeutung verliert. Dies impliziert einen Substratkontakt, der etwa 3 Nukleotide von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung entfernt sein könnte, und entspricht dem Modell, in dem die nächste Phosphatgruppe, zu der die Aminogruppe des Lysin 132 einen Kontakt herstellen könnte, die zweite 5' von der zu spaltenden Bindung ist.

Ebensoweit entfernt oder etwas näher an der Spaltstelle könnte sich das von der Aminosäure Lys196 kontaktierte Phosphat befinden, da der Verlust dieser positiven Ladung bei der Hydrolyse von Substraten, die kürzer sind als Pentanukleotide, keine Rolle mehr spielt. Zugleich legt die Situation im Bindungsmodell einen Kontakt zu einem Phosphatrest nahe, der sich in

einer Entfernung von etwa zwei Nukleotiden von der zu spaltenden Bindung, bei einem Doppelstrang möglicherweise auf dem Gegenstrang, befindet.

Zusätzlich zu den genannten Aminosäuren könnten auch Lys55 und Arg125 am Aufbau einer Substratbindungsstelle beteiligt sein. Die Mutanten K55A und R125A sind in ihrer Aktivität zwar eingeschränkt, weisen jedoch keinen signifikanten  $K_M$ -Effekt auf. Bei der Spaltung kurzer Substrate ist ein Übergang von reduzierter Aktivität zu Wildtyp-Aktivität bei der Variante K55A erst bei sehr kurzen Substraten, bei R125A bei einer Länge von 6 bis 8 Nukleotiden zu beobachten, was auf einen möglichen Kontakt zu einem 3 bis 4 Nukleotide entfernten Phosphat hindeutet. Die Aminosäure Lys55 scheint jedoch, wenn man von dem Bindungsmodell in **Abb. 4-6** ausgeht, zu weit entfernt zu sein, um einen Beitrag zur Bindung eines Substrates leisten zu können.

Auch für die übrigen untersuchten Nuklease-Varianten K48A, K84A und R136A, die weder bei kinetischen Experimenten noch bei der Untersuchung des makroskopischen Spaltverhaltens im Plasmidspalt-Assay aufgefallen waren, und die auch bei der Spaltung kurzer Oligonukleotidsubstrate eine dem Wildtyp-Enzym entsprechende Aktivität zeigen, ist die Beteiligung an der Substratbindung unwahrscheinlich, da diese Aminosäurereste sich in zu großer Entfernung von der vermutlichen Substratbindungsstelle befinden. Die Funktion des Arg136 liegt eher in der Beteiligung am Aufbau der Dimerisierungsfläche der *Serratia* Nuklease, wo die Guanidinium-Gruppe des Arginins mit der Carboxylgruppe eines Aspartats eine der insgesamt 4 intermolekularen Salzbrücken des Dimer-*interfaces* bildet (Miller & Krause, 1996). Dies mag auch der Grund für die um 60 % reduzierte Aktivität der Alanin-Mutante (s. Kap. 3.2.1.1) sowie das leicht veränderte CD-Spektrum dieser Variante (s. Kap. 3.1.2) sein. Zusätzlich zu den genannten basischen Aminosäuren könnte die aromatische Seitenkette des Trp123, möglicherweise durch *stacking*-Wechselwirkungen, mit einem gebundenen Substrat der *Serratia* Nuklease interagieren. Ein Kontakt zu einer Base, die 1 oder 2 Positionen 5' von der zu spaltenden Phosphodiesterbindung entfernt liegt, ist dabei am wahrscheinlichsten.

Die Bedeutung der untersuchten basischen Aminosäuren wird auch im Grad der Konservierung dieser Reste innerhalb der Gruppe homologer Nukleasen des *Serratia*-Typs deutlich (**Abb. 4-7**).

	Lys48	Lys55	Lys60	Tyr76	Lys84
		Arg57			Arg87
S.marcescens	HITKDT-----	PASGKTR-----	NWKTDPALNPADTL-----	APADYTGANAA---	LKVD <sup>RGH</sup> OAPLASLAG-
H.sapiens	QLRPER-----	LRGDGDRRECDFREDDSVHAYHRA-----	TNVDYRG-----	SGFD <sup>RGH</sup> LAAAANHRWS	
B.taurus	QLRPEG-----	LRGDGNRSSCDFHEDDSVHAYHRA-----	TNADYRG-----	SGFD <sup>RGH</sup> LAAAANHRWS	
M.musculus	QLRPER-----	LRGDGDRSACDFREDDSVHAYHRA-----	TNADYRG-----	SGFD <sup>RGH</sup> LAAAANHRWS	
C.elegans	HLTPER-----	LKHAEGVDRKLCEFKPDI <sup>TFF</sup> QKFLS-----	QNTDYKC-----	SGFD <sup>RGH</sup> LAAAGNHRKS	
D.melanogaster	HLQADS-----	IHPNRGRGRNPYPDDLVP <sup>SNFRS</sup> -----	ELSDYRR-----	SGFD <sup>RGH</sup> LAAAGNHHLQ	
C.echinulata	HLTADS-----	LKTGDGVD <sup>RDHSKF</sup> KEDPDVPSLFRS-----	TLADYSG-----	SGFD <sup>RGH</sup> MAPAGDAVAT	
S.cerevisiae	HITPES-----	LAARN-ADRKN <sup>SFF</sup> KEDEVIPEKFRG-----	KLRDYFR-----	SGYD <sup>RGH</sup> OAPAAAKFS	
S.pombe	TITQES-----	LNQRK-GNRRYSEFVPDDNIPEMFQA-----	KLGDYRG-----	SGYD <sup>RGH</sup> QVPAADCKFS	
T.brucei	YIPGTTTAA <sup>DSVVTADNDLVNASAAEAQ</sup> RDGMRFFADMTVPQLFRV-----	QPGDYIGGGRGQDSRGLS <sup>RGH</sup> LAAAQFHKSS			
B.burgdorferi	LLKSKK-----	IKRST-KFFEDTNIKGAFP-----	KLEDYFK-----	SGYD <sup>RGH</sup> IVSSADMSFS	
C.jejuni	-MKDRQIK-----	KRP-RFEDDTNIPKKYRT-----	TWSNYKN-----	SGYT <sup>RGH</sup> TAPNASFSXX	
Anabaena_sp.	QLN <sup>SSW</sup> -----	LGNAERQ-DNFPDKTLPAGWVRV-----	TPSMYSG-----	SGYD <sup>RGH</sup> IAP <sup>SADRTKT</sup>	
Rhizobium_sp.	LNANPKRKMA--FYTAVNIDGARW <sup>TNLE</sup> RGNDVWFYDPR <sup>IPEELQN</sup> -----	GDELYGDEPVP <sup>SK-NYFD</sup> <sup>RGH</sup> LVRRLDPVWG			
G.gallus	QLMGLSY-----	PKTME-RE--WTL <sup>SKYYSVTSEQLGKSQA</sup> ILQDYKNL-----	TGLN <sup>RGH</sup> LNP <sup>SGHHS</sup> DS		
		Arg125	Lys132		
		Trp123	Arg131	Arg136	
S.marcescens	-----VSDWESLNYL-SNITPQKSD-LNQ--GAWARLEDOERKLIDRADISSVYTVTGPLYERDMG-----				
H.sapiens	-----QKAMDDTFYL-SKVAPOVTH-LNQ--NANNLEKYSRLSTRSYQN--VYVCTGPLFLPRT <sup>EADG</sup> -----				
B.taurus	-----QKAMDDTFYL-SNVAPQVPH-LNQ--NANNLEKYSRLSTRSYQN--VYVCTGPLFLPRT <sup>EADG</sup> -----				
M.musculus	-----QKAMDDTFYL-SNVAPQVPH-LNQ--NANNLEKYSRLSTRSYQN--VYVCTGPLFLPRT <sup>EADG</sup> -----				
C.elegans	-----QLAVDQTFYL-SNMSPOVGRGFNR--DKW <sup>NDLEMHCR</sup> RLVAKMIN--SYITGPLYLPKLEGDG-----				
D.melanogaster	-----QNHCEDTFYL-TNIAPQVQGGFNR--SAW <sup>NNLEQYV</sup> RNLVH <sup>RF</sup> GS--VFVCTGPLYKPNQRP <sup>GG</sup> -----				
C.echinulata	-----QPAMDQTFYL-SNMSPOVGIGFNR--HYWAYLEGFC <sup>RL</sup> SLTK <sup>KF</sup> SD--VYVFTGPLFLP <sup>TKGSDG</sup> -----				
S.cerevisiae	-----QQAMDDTFYL-SNMCPOVGEGFNR--DYWAHLEYFC <sup>RL</sup> GLTK <sup>KY</sup> KS--VRIVTGPLYLPK <sup>KDPIDN</sup> -----				
S.pombe	-----QEAMNETFYL-SNMCPOVGEGFNR--NWAYFEDWC <sup>RL</sup> RLTS <sup>KY</sup> GS--VTIMTGPLYLPK <sup>KNERG</sup> -----				
T.brucei	-----TVELAQTFNMNANTVPODMT-MNA--VDW <sup>RLLENLT</sup> RLRRYERG-LWVVTGPVFH <sup>PLRVDG</sup> DVRTWRWAEP <sup>SQCPS</sup> -----				
B.burgdorferi	-----ENAMKDTYFL-SNMSPOKSE-FNS--GIW <sup>LKLEKL</sup> VREWAISKGY--IYIISAGILTENK--G-----				
C.jejuni	-----KAAQNSVFLM-SNITPQNAQ- <sup>INX</sup> --KIWNXIEQRE <sup>RL</sup> LALEFQS--IEVLNLVLYDK <sup>EP</sup> -----				
Anabaena_sp.	-----TEDNAATFLM-TNMMPQTPD-NNR--NTW <sup>GNLEDY</sup> C <sup>REL</sup> VSQKE--LYIVAGPNSGLK <sup>PLKG</sup> -----				
Rhizobium_sp.	EIRVAKQANDDTFQW-TNCSPQYWG <sup>F</sup> -NQGADI <sup>W</sup> QGLENFLLYNTDDENVQ-ASVFSGLPFRADDEEHR-----				
G.gallus	-----SSRAATFSL-TNIVPQNEK-LNG--GAW <sup>NNYE</sup> QQTMMRTVGCN-TTYIVVGAVPGNN-----				
					Lys196
S.marcescens	-----	-----KLPGTQKAHTIPSAYWKVIFINN--SP--AVNHYAAFLFDQ--NTP <sup>KG</sup> -----			
H.sapiens	-----	-----KSYVKYQVIGKN-HVAVPTHFFKVLILEA--AG--GQIELR <sup>SYVMPN</sup> --APVDEA			
B.taurus	-----	-----KSYVKYQVIGKN-HVAVPTHFFKVLILEA--AG--GQIELR <sup>SYVMPN</sup> --APVDEA			
M.musculus	-----	-----KSYVKYQVIGKN-HVAVPTHFFKVLILEA--AG--GQIELR <sup>SYVMPN</sup> --APVDET			
C.elegans	-----	-----KKYIKYQVIGDN-NVAVPTHFFKVALFEV--TP--GKFELESYILPN--AVIEDT			
D.melanogaster	-----	-----KWAVEYEMIGLN-MVAVPTHFFKVIMVES--KLHLGKPYMEGYVLPN--APIPDG			
C.echinulata	-----	-----KYTVTYNVLQGN--VAVPTHFYKVLVPOG--DNKYAYGAFILPN--QAIDTK			
S.cerevisiae	-----	-----KFRVNYEYVIGNPPSIAVPTHFFKLIVAEAPTANPAREDIAVAAFLPN--EPISNE			
S.pombe	-----	-----QWEVQYRVIGNPPNVAVPTHFFKVIAEK-SGEPT-SSPSVAAFLPN--KPIADN			
T.brucei	PVKPVSSGVLASGEHCHGNDKAAVHLRKIVCYELVGKR-DVAVPTHLFKVILGER--AD--GAHEAAAF <sup>FLMPN</sup> --EPIAVE				
B.burgdorferi	-----	-----FIGKN-KILIPKNFYKIVLAIN--NN--NYDYIISFIIPN--EKAK <sup>D</sup> -----			
C.jejuni	-----	-----QYIKNR--IAIPSFYVKIIKTPK-----F-KECYQAPN--HEVND-			
Anabaena_sp.	-----	-----KVTVPKSTWKIVVVLDS <sup>PGSGLEGITANT</sup> -----R-VIAVNIPN--DPELN-			
Rhizobium_sp.	-----	-----GILIPQFFWKVIAVTDKNDRLYTSGYMVS-----QQDYALDIPFERLPVGP <sup>N</sup>			
G.gallus	-----	-----YIAGK-RVNKPSHIWSSACCEV-DKN--HREAWGVIAEN--DKNEVQ			

**Abb. 4-7:** Vergleich eines Teils der Aminosäuresequenzen homologer Vertreter von DNA/RNA unspezifischen Nukleasen aus der *Serratia* Nuklease-Familie. Die in dieser Arbeit untersuchten 11 basischen und 2 aromatischen Aminosäuren der *Serratia* Nuklease und entsprechende Reste in den Homologen sind rot gekennzeichnet. Dunkel unterlegt sind jeweils die Reste des DRGH-Motivs (PROSITE-Motiv PDOC00821) sowie das für die Metallbindung essentielle Asparagin (nach Meiss *et al.*, 1999).

Während die für die Bindung bzw. Katalyse essentiellen Arginine an den Positionen 57, 87 und 131 innerhalb der Nuklease-Familie streng konserviert sind (Friedhoff *et al.*, 1996b), befindet

sich an der dem Lys60 entsprechenden Position in den homologen Proteinen immerhin zu 50 % ebenfalls ein Lysin bzw. ein Arginin.

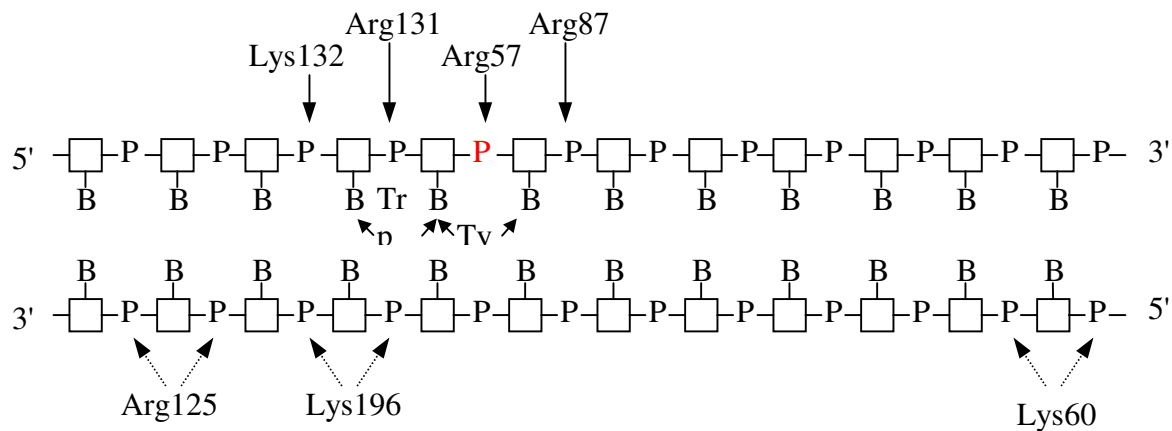
Die teilweise Konservierung einer basischen Aminosäure an der dem Arg136 der *Serratia* Nuklease entsprechenden Stelle könnte in der Beteiligung dieses Restes an der Bildung der Dimerisierungsfläche begründet sein. Auch für einige andere Vertreter dieser Familie ist bekannt, daß sie Homodimere bilden, z.B. für die Hefe-Nuklease NUC1 (Vincent *et al.*, 1988). So könnte auch bei diesen Nukleasen ein basischer Rest eine dem Arg136 analoge Rolle spielen. Basische Aminosäuren an den Positionen 132 und 125 sind lediglich zu 25 bzw. 20 % konserviert, während die Aminosäurereste Lys48, Lys55, Lys84 und Lys196 innerhalb der *Serratia* Nuklease-Familie keine Entsprechung finden. Dagegen sind die aromatischen Aminosäuren Tyr76 und Trp123 wiederum sehr streng konserviert (Meiss *et al.*, 1999).

Der Grad der Konservierung der genannten Aminosäurereste nimmt also mit zunehmendem Abstand vom aktiven Zentrum der Nukleasen ab, was auf einen ähnlichen Bindungsmodus der jeweiligen Nukleinsäure in den aktiven Zentren hindeutet, während die flankierenden Phosphatreste offensichtlich von unterschiedlichen Regionen der Nukleasen gebunden werden. Eine Ausnahme stellt die Aminosäure Lys60 dar, die trotz ihrer größeren Entfernung vom aktiven Zentrum der *Serratia* Nuklease erstaunlich konserviert vorliegt. Dies unterstreicht die schon aufgezeigte mögliche Bedeutung dieses Restes für die Ausbildung eines Enzym-Substrat-Kontaktes weit über die Interaktionen in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums hinaus.

Insgesamt läßt sich aus den Ergebnissen der Experimente zur Substratbindung der *Serratia* Nuklease ein Modell der möglichen Protein-DNA-Kontakte erstellen, das mehrere elektrostatische Wechselwirkungen zwischen basischen Aminosäuren und dem Phosphatrückgrat einer gebundenen Nukleinsäure und einen möglichen Basenkontakt einschließt (**Abb. 4-8**). Dabei spielt es keine Rolle, ob das jeweilige Substrat doppel- oder einzelsträngig vorliegt, da eine Nukleinsäure, zumal in den äußeren Bindungsregionen, so flexibel ist, daß bei längeren Substraten in beiden Fällen auch äußere Kontaktpositionen erreicht werden könnten, die zu einer effektiven Bindung beitragen können.

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß die Aktivität der *Serratia* Nuklease mit zunehmender Länge der Nukleinsäure ansteigt (Kolmes, 1995; Friedhoff, 1995), was hauptsächlich auf die Besetzung zusätzlicher Bindungsstellen zurückzuführen sein dürfte. Bei

vielen anderen Nukleasen ist der gleiche Effekt zu beobachten, wobei sich jedoch die Besetzung von *subsites* bzw. die Mutation daran beteiligter Aminosäuren z.B. bei einigen Ribonukleasen eher auf den  $k_{\text{cat}}$ -Wert als auf den  $K_M$ -Wert auswirkt (Fersht, 1985; Steyaert & Engelborghs, 1995). Dies kann durch die größere Spezifität dieser Enzyme begründet werden, die sich beispielsweise bei der RNase T1 nicht nur auf die wichtigste Bindungsstelle bezieht, die spezifisch für Guanine ist, sondern bei denen darüberhinaus z. T. auch die übrigen Basen-*subsites* starke Präferenzen für bestimmte Nukleobasen besitzen (Steyaert, 1997).



**Abb. 4-8:** Modell möglicher Interaktionen zwischen Aminosäureresten der *Serratia* Nuklease und einem doppelsträngigen Nukleinsäuresubstrat. Die zu spaltende Phosphodiesterbindung ist rot gekennzeichnet (P: Phosphat; B: Base).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens* ist aufgrund der Tatsache, daß ihre strukturellen und funktionellen Eigenschaften in den letzten Jahren intensiv erforscht worden sind, zu einem Leitenzym für eine große Gruppe ebenfalls unspezifischer Nukleasen geworden. Daneben existiert vermutlich ein vergleichbarer Katalysemechanismus bei einer Familie von hochspezifischen *Homing*-Endonukleasen, deren aktive Zentren eine große strukturelle Ähnlichkeit zu dem der *Serratia* Nuklease aufweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitergehende biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung der *Serratia* Nuklease durchgeführt, wobei der Schwerpunkt auf der Analyse des Katalysemechanismus sowie der Substratbindung lag. Dazu wurden durch gezielte Aminosäureaustausche Mutanten des Enzyms generiert, als rekombinante Proteine aus *E. coli*-Kulturen aufgereinigt und anschließend biochemisch untersucht.

Anhand der Analyse des pH-Profiles und der Metallionenabhängigkeit von Varianten mit Mutationen an der Position 119 wurde bereits vor Bekanntwerden der genauen Struktur der Metall-Koordinationssphäre die essentielle Funktion des Asparagin 119 für die Bindung des Cofaktors herausgestellt. Diese Aminosäure bildet über seine Amidgruppe den einzigen direkten Proteinkontakt zu dem Magnesiumion aus, was eine für Proteine sehr ungewöhnliche Form der Metallionen-Koordinierung darstellt.

Die Verbindung Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat wurde als neues artifizielles Minimalsubstrat der *Serratia* Nuklease etabliert, nachdem die genaue Spaltposition innerhalb dieser Verbindung bestimmt worden war. Mit diesem Substrat kann unter anderem die strukturelle Integrität der aktiven Zentren neu generierter Nuklease-Varianten überprüft werden, da herausgestellt wurde, daß Mutationen an Aminosäuren, die nicht direkt das aktive Zentrum bzw. die essentiellen Aminosäuren His89 und Asn119 betreffen, auf die Umsetzung von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat keine Auswirkungen haben. Weiterhin wurde mit Hilfe dieses Substrates das lange Zeit umstrittene Modell gestützt, bei dem das Histidin 89 während der Katalyse die Funktion der allgemeinen Base übernimmt, da aufgrund eines sehr niedrigen  $pK_a$ -Wertes der Abgangsgruppe eine Säure für die Hydrolyse von Desoxythymidin-di-3'-5'-(*p*-nitrophenyl)-phosphat entbehrlich ist, die Mutante H89A dieses Substrat jedoch nicht spaltet.



Bis heute liegt keine Kristallstrukturanalyse für die *Serratia* Nuklease im Komplex mit einem Substrat vor, so daß wenig über die Art der Bindung einer Nukleinsäure bekannt ist. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die mögliche Beteiligung von 11 basischen und 2 aromatischen Aminosäuren, die die vermutete Substratbindungstasche des Enzyms bilden sollten, untersucht. Dazu wurden mittels PCR-Mutagenese Alaninmutanten dieser Aminosäurereste generiert, die hinsichtlich ihrer Fähigkeit, hochmolekulare DNA sowie verschiedene kurze Substrate zu hydrolysieren, und in bezug auf die Spaltung überspiralisierter Plasmid-DNA analysiert wurden. Substrate mit einer abasischen *site* wurden eingesetzt, um die Mutanten der aromatischen Aminosäuren Tyr76 und Trp123 zu untersuchen.

Ausgehend von den genannten Experimenten wurde ein Modell der Nukleinsäure-Bindung der *Serratia* Nuklease über multiple Substratbindungsstellen erarbeitet, bei dem sieben basische Aminosäuren an der Ausbildung von Phosphatbindungsstellen beteiligt sind, und aromatische Reste möglicherweise mit den Basen einer gebundenen Nukleinsäure in Kontakt treten.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Ahrenholtz, I., Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1994). The extracellular nuclease of *Serratia marcescens*: Studies on the activity in vitro and effect on transforming DNA in a groundwater aquifer microcosm. *Arch. Microbiol.* **161**, 176-183.

Anderson, J.E. (1993). Restriction endonucleases and modification methylases. *Curr. Opinion Struct. Biol.* **3**, 24-30.

Antosiewicz, J., Miller, M.D. & Krause, K.L. (1997). Simulation of electrostatic and hydrodynamic properties of *Serratia* endonuclease. *Biopolymers* **41**, 443-450.

Asubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. (1987-2000). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

Ball, T.K., Sih, Y. & Benedik, M.J. (1992). Disulfide bonds are required for *Serratia marcescens* nuclease activity. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4971-4974.

Baldwin, G.S., Sessions, R.B., Erskine, S.G. & Halford, S.E. (1999). DNA cleavage by the EcoRV restriction endonuclease: roles of divalent metal ions in specificity and catalysis. *J. Mol. Biol.* **288**, 87-103.

Barettino, D., Feigenbutz, M. Valcarel, R. & Stunnenberg, H.G. (1994). Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 541-542.

Been, M.D. (1993). Nucleases that are RNA. In: Linn, S.M., Lloyd, R.S. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (2<sup>nd</sup>). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 407-437.

Beese, L.S. & Steitz, T.A. (1991). Structural basis for the 3'→5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.* **10**, 25-33.

Belfort, M. & Roberts, R. (1997). Homing endonucleases – keeping the house in order. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3379-3388.

Beliaeva, M.I., Kapranova, M.N., Vitol, M.I., Golubenko, I.A. & Leshchinskaia, I.B. (1976). Nucleic acids utilized as the main source of bacterial nutrition. *Mikrobiologiia* **45**, 420-424.

Benedik, M.J. & Strych, U. (1998). *Serratia marcescens* and its extracellular nuclease. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 1-13.

Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Bisno, A.L. (1995). *Streptococcus pyogenes*. In: Mandell, G.L., Bennett, J.E. & Dolin, R. (ed.). *Principles and practice of infectious diseases*. (4<sup>th</sup>), Churchill Livingstone, New York, 1786-1799.

Boocock, M.R., Zhu, X. & Grindley, N.D. (1995). Catalytic residues of gamma delta resolvase act in cis. *EMBO J.* **14**, 5129-5140.

Boyer, P.D. (1971). *Hydrolysis*. In: The Enzymes, Vol IV, 3<sup>rd</sup> ed., *Academic Press*, New York, London.

Braun, V. & Schmitz, G. (1980). Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **124**, 55-61.

Brown, R.S., Dewan, J.C. & Klug, A. (1985). Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry* **24**, 4785-4801.

Brown, T.A. (ed.) (1991). *Molecular Biology Labfax*. BIOS Scientific Publishers Limited Oxford.

Brownlee, G.G. & Sanger, F. (1969). Chromatography of <sup>32</sup>P-labelled oligonucleotides on thin layers of DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **11**, 395-399.

Buckle, A.M. & Fersht, A.R. (1994). Subsite binding in an RNase: Structure of a Barnase-Tetranucleotide complex at 1.76-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 1644-1653.

Buckle, A.M., Schreiber, G. & Fersht, A.R. (1994). Protein-protein recognition: crystal structural analysis of a barnase-barstar complex at 2.0-Å resolution. *Biochemistry* **33**, 8878-8889.

Cantor, C.R. & Schimmel, P.R. (1980). *Biophysical Chemistry*. W.H. Freeman & Company, San Francisco.

Chambers, J.A.A. & Rickwood, D. (eds.) (1993). *Biochemistry Labfax*. BIOS Scientific Publishers Limited Oxford.

Chen, L.Y., Ho, H.C., Tsai, Y.C. & Liao, T.H. (1993). Deoxyribonuclease of *Syncephalostrum racemosum* – enzymatic properties and molecular structure. *Arch. Biochem. Biophys.* **303**, 51-56.

Chevalier, B.S.; Monnat, R.J. Jr. & Stoddard, B.L. (2001). The homing endonuclease I-CreI uses three metals, one of which is shared between the two active sites. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 312-316.

Chung, C.T., Niemela, S. L. & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 2172-2175.

Cooper, A.A. & Stevens, T.H. (1995). Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 351-356.

Counis, M.F. & Torriglia, A. (2000). DNases and apoptosis. *Biochem. Cell Biol.* **78**, 405-414.

Courtney, M., Buchwalder, A., Tessier, L.H., Jaye, M., Benavente, A., Balland, A., Kohli, V., Lathe, R., Tolstoshev, P. & Lecocq, J.P. (1984). High level production of biologically active human  $\alpha$ 1-antitrypsin in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 669-673.

Cuatracasas, P., Wilcheck, M. & Anfinsen, C.B. (1969). The action of *Staphylococcal* Nuclease on synthetic substrates. *Biochemistry* **8**, 2277-2284.

Deutscher, M.P. (1993). Promiscuous exoribonucleases of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4577-4583.

Doherty, A.J., Worrall, A.F. & Connolly, B.A. (1995). The roles of Arginine 41 and Tyrosine 76 in the coupling of DNA recognition to phosphodiester bond cleavage by DNase I: A study using site-directed mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **251**, 366-377.

Eaves, G.N. & Jeffries, C.D. (1963). Isolation and properties of an exocellular nuclease of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **85**, 273-278.

Eun, H.-M. (1996). Enzymology primer for recombinant DNA technology. Academic Press. New York, London.

Evans, S.J., Shipstone, E.J., Maughan, N. & Connolly, B.A. (1999). Site-directed mutagenesis of phosphate-contacting amino acids of Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease I. *Biochemistry* **38**, 3902-3909.

Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and Mechanism*, 2<sup>nd</sup> edit., Freeman, New York.

Fickling, M.M., Fischer, A., Mann, B.R., Packer, J., Vaughan, J. (1959). *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 4226-4230.

Filimonova, M.N., Baratova, L.A., Vospelnikova, N.D., Zheltova, A.O. & Leshchinkaia, I.B. (1981). *Serratia marcescens* endonuclease. Properties of the enzyme. *Biokhimiia* **46**, 1660-1666.

Filimonova, M.N., Krause, K.L. & Benedik, M.J. (1994). Kinetic studies of the *Serratia marcescens* extracellular nuclease isoforms. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **33**, 1229-1236.

Flick, K.E., McHugh, D., Heath, J.D., Stephens, K.M., Monnat, R.J. Jr. & Stoddard, B.L. (1997). Crystallization and preliminary X-ray studies of I-*Ppo* I: a nuclear, intron-encoded homing endonuclease from *Physarum polycephalum*. *Protein Sci.* **6**, 2677-2680.

Flick, K.E., Jurica, M.S., Monnat, R.J. Jr. & Stoddard, B.L. (1998). DNA binding and cleavage by the nuclear intron-encoded homing endonuclease I-*Ppo* I. *Nature* **394**, 96-101.

Focareta, T. & Manning, P.A. (1991). Distinguishing between the extracellular DNases of *Vibrio cholerae* and development of a transformation system. *Mol. Microbiol.* **5**, 2547-2555.

Franke, I. (1998). Die dimere Endonuklease aus *Serratia marcescens* und die monomere Endonuklease aus *Anabaena* sp. PCC 7120: Eine Fallstudie zur Bedeutung der Quartärstruktur DNA/RNA-unspezifischer Nukleasen unter Berücksichtigung biotechnologischer Anwendungsmöglichkeiten. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Franke, I., Meiss, G., Blecher, D., Gimadutdinow, O., Urbanke, C. & Pingoud, A. (1998). Genetic engineering, production and characterisation of monomeric variants of the dimeric *Serratia marcescens* endonuclease. *FEBS Lett.* **425**, 517-522.

Franke, I. & Pingoud, A. (1999a). Synthesis and biochemical characterisation of obligatory dimers of the sugar non-specific nuclease from *Serratia marcescens* using specifically designed bismaleimidoalkanes as SH-specific crosslinking reagents. *J. Protein Chem.* **18**, 137-146.

Franke, I., Meiss, G. & Pingoud, A. (1999b). On the advantage of being a dimer: A case study using the dimeric *Serratia* Nuklease and the monomeric nuclease from *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Biol. Chem.* **274**, 825-832.

Freifelder, D. (1982). *Physical Biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology*. W.H. Freeman & Company, New York.

Friedhoff, P., Gimadutdinow, O., Rüter, T., Wende, W., Urbanke, C., Thole, H. & Pingoud, A. (1994a). A procedure for renaturation and purification of the extracellular *Serratia marcescens* nuclease from genetically engineered *Escherichia coli*. *Protein Expression Purification* **5**, 37-43.

Friedhoff, P., Gimadutdinow, O. & Pingoud, A. (1994b). Identification of catalytically relevant amino acids of the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease by alignment-guided mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3280-3287.

Friedhoff, P. (1995). Das aktive Zentrum der extrazellulären Endonuklease aus *Serratia marcescens*: Identifizierung und Charakterisierung. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Friedhoff, P., Meiss, G., Kolmes, B., Pieper, U., Gimadutdinow, O., Urbanke, C. & Pingoud, A. (1996a). Kinetic analysis of the cleavage of natural and synthetic substrates by the *Serratia* nuclease. *Eur. J. Biochem.* **241**, 572-580.

Friedhoff, P., Kolmes, B., Gimadutdinow, O., Wende, W., Krause, K.L. & Pingoud, A. (1996b). Analysis of the mechanism of the *Serratia* nuclease using site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2632-2639.

Friedhoff, P., Matzen, S.E., Meiss, G. & Pingoud, A. (1996c). A quantitative microtiter plate nuclease assay based on Ethidium/DNA fluorescence. *Anal. Biochem.* **240**, 283-288.

Friedhoff, P., Franke, I., Meiss, G., Wende, W., Krause, K.L. & Pingoud, A. (1999a). A similar active site for non-specific and specific endonucleases. *Nature Struct. Biol.* **6**, 112-113.

Friedhoff, P., Franke, I., Krause, K.L. & Pingoud, A. (1999b). Cleavage experiments with deoxythymidine 3' -5'-bis( $\alpha$ -nitrophenyl phosphate) suggest that the homing endonuclease I-*PpoI* follows the same mechanism of phosphodiester bond hydrolysis as the non-specific *Serratia* nuclease. *FEBS Letters* **443**, 209-214.

Galburt, E.A., Chevalier, B., Tang, W., Jurica, M.S., Flick, K.E., Monnat, R.J. Jr. & Stoddard, B.L. (1999). A novel endonuclease mechanism directly visualized for I-*PpoI*. *Nature Struct. Biol.* **6**, 1096-1099.

Gast, F.U., Franke, I., Meiss, G. & Pingoud, A. (2001). Immobilization of sugar-non-specific nucleases by utilizing the streptavidin--biotin interaction. *J. Biotechnol.* **87**, 131-141.

Goodman, M.F. & Bloom, L.B. (1993). Proofreading exonucleases: Error correction during DNA replication. In: Linn, S.M., Lloyd, R.S. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (2<sup>nd</sup>). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 235-262.

Grilley, M., Holmes, J., Yashar, B. & Modrich, P. (1990). Mechanism of DNA-mismatch correction. *Mutat. Res.* **236**, 253-267.

Hale, S.P., Poole, L.B. & Gerlt, J.A. (1993). Mechanism of the reaction catalyzed by staphylococcal nuclease. *Biochemistry* **32**, 7479-7487.

Heller, K.B. (1979). Lopolytic activity copurified with the outer membrane of *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **140**, 1120-1122.

Hertzberg, R.P. & Dervan, P.B. (1982). Cleavage of double helical DNA by (methidiumpropyl-EDTA)iron(II). *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 313-315.

Hochuli, E., Döbeli, H. & Schacher, A. (1987). New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatography*, **411**, 177-184.

Honig, B. & Nicholls, A. (1995). Classical electrostatics in biology and chemistry. *Science* **268**, 1144-1149.

Ish-Horowicz, D. & Burke, J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2989.

Ito, W., Ishiguro, H. & Kurosawa, Y. (1991). A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* **102**, 67-70.

Iwasaki, M., Igarashi, H. & Yutsudo, T. (1997). Mitogenic factor secreted by *Streptococcus pyogenes* is a heat-stable nuclease requiring His122 for activity. *Microbiology* **143**, 2449-2455.



Jeltsch, A., Alves, J., Wolfes, H. & Pingoud, A. (1993). Substrate-assisted catalysis in the cleavage of DNA by the *EcoRI* and *EcoRV* restriction enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8499-8503.

Jeltsch, A. & Pingoud, A. (2001). Methods for determining activity and specificity of DNA binding and DNA cleavage by class II restriction endonucleases. *Methods Mol. Biol.* **160**, 287-308.

Jernigan, R., Raghunathan, G. & Bahar, I. (1994). Characterization of interactions and metal ion binding sites in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 256-263.

Johansen, S., Embley, T.M. & Willassen, N.P. (1993). A family of nuclear homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4405.

Jones, J.D.G., Grady, K.L., Suslow, T.V. & Bedbrook, J.R. (1986). Isolation and characterization of genes encoding two chitinases for the extracellular phospholipase A1 from *Serratia liquefaciens*. *EMBO J.* **5**, 469-473.

Kleanthous, C., Kühlmann, U.C., Pommer, A.J., Ferguson, N., Radford, S.E., Moore, G.R., James, R. & Hemmings, A.M. (1999). Structural and mechanistic basis of immunity toward endonuclease colicins. *Nature Struct. Biol.* **6**, 243-251.

Kolmes, B. (1995). Kinetische und thermodynamische Untersuchungen zur Bindung und Spaltung verschiedener Oligonukleotidsubstrate durch die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Kolmes, B., Franke, I., Friedhoff, P. & Pingoud, A. (1996). Analysis of the reaction mechanism of the non-specific endonuclease of *Serratia marcescens* using an artificial minimal substrate. *FEBS Letters* **397**, 343-346.

Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. & cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**, 147-157.

Kühlmann, U.C., Moore, G.R., James, R., Kleanthous, C. & Hemmings, A.M. (1999). Structural parsimony in endonuclease active sites: should the number of homing endonuclease families be redefined? *FEBS Lett.* **463**, 1-2.

Kunitz, M. (1950). Crystalline desoxyribonuclease I. Isolation and general properties. Spectrophotometric method for the measurement of desoxyribonuclease activity. *J. Gen. Physiol.* **33**, 349-362.

Lacks, S. & Greenberg, B. (1973). Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **114**, 152-163.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Liao, T. (1975). Deoxythymidine 3',5'-~~D~~i-nitrophenyl phosphate as a synthetic substrate for Bovine Pancreatic Deoxyribonuclease. *J. Biol. Chem.* **250**, 3721-3724.

Lunin, V.Y., Levnikov, V.M., Shlyapnikov, S.V., Blagova, E.V., Lunin, V.V., Wilson, K.S. & Mikhailov, A.M. (1997). Three-dimensional structure of *Serratia marcescens* nuclease at 1.7 Å resolution and mechanism of its action. *FEBS Letters* **412**, 217-222.

Luria, S.E. & Human, M.L. (1952). A non-hereditary, host induced variation of bacterial viruses. *J. Bacteriol.* **64**, 557-569.

Mannino, S.J., Jenkins, C.L. & Raines, R.T. (1999). Chemical mechanism of DNA cleavage by the homing endonuclease I-PpoI. *Biochemistry* **38**, 16178-16186.

Meiss, G., Friedhoff, P., Hahn, M., Gimadutdinow, O. & Pingoud, A. (1995). Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry* **34**, 11979-11988.

Meiss, G. (1997). Biochemische Charakterisierung der DNA/RNA-unspezifischen Endonuklease NucA und deren Inhibitor NuiA aus *Anabaena sp.* PCC 7120 sowie der extrazellulären Endonuklease aus *Serratia marcescens*. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Meiss, G., Franke, I., Gimadutdinow, O., Urbanke, C. & Pingoud, A. (1998). Biochemical characterization of *Anabaena sp.* strain PCC 7120 non-specific nuclease NucA and its inhibitor NuiA. *Eur. J. Biochem.* **251**, 924-934.

Meiss, G., Gast, F.U. & Pingoud, A. (1999). The DNA/RNA non-specific *Serratia* nuclease prefers double-stranded A-form nucleic acids as substrates. *J. Mol. Biol.* **288**, 377-390.

Meiss, G., Gimadutdinow, O., Haberland, B. & Pingoud, A. (2000). Mechanism of DNA cleavage by the DNA/RNA-non-specific *Anabaena sp.* PCC 7120 endonuclease NucA and its inhibition by NuiA. *J. Mol. Biol.* **297**, 521-534.

Merck (1989). Benzon nuclease. *Biochem. Service.* 1.89.

Merck (1993). Benzonase<sup>®</sup>. *Biochem. Service.* 2.

Merck (1995). Benzonase<sup>®</sup> für die Footprint-Analyse, Proteinase K immobilisiert. *Biochem. Service.* 1.95.

Miller, M.D., Benedik, M.J., Sullivan, M.C., Shipley, N.S. & Krause, K.L. (1991). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel nuclease of *Serratia marcescens*. *J.Mol. Biol.* **222**, 27-30.

Miller, M.D., Tanner, J., Alpaugh, M., Benedik, M.J. & Krause, K.L. (1994). 2.1 Å structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nature Struct. Biol.* **1**, 461-468.

Miller, M.D. & Krause, K.L. (1996). Identification of the *Serratia* endonuclease dimer: Structural basis and implications for catalysis. *Protein Science* **5**, 24-33.

Miller, M.D., Cai, J. & Krause, K.L. (1999). The active site of *Serratia* endonuclease contains a conserved magnesium-water cluster. *J. Mol. Biol.* **288**, 975-987.

Modrich, P. (1994). Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* **266**, 1959-1960.

Molla, A., Matsumura, Y., Yamamoto, T., Okamura, R. & Maeda, H. (1987). Pathogenic capacity of proteases from *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* and their suppression by chicken egg white ovomacroglobulin. *Infect. Immun.* **55**, 2509-2517.

Moore, S. (1981). Pancreatic DNase. In: Boyer, P.D. (ed.). *The enzymes*. Vol. XIV, Academic Press, New York, London.

Muro-Pastor, A.M., Flores, E., Herrero, A. & Wolk, C.P. (1992). Identification, genetic analysis and characterization of a sugar-non-specific nuclease from the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **6**, 3021-3030.

Muro-Pastor, A.M., Flores, E., Herrero, A. & Flores, E. (1997). The *nuiA* gene from *Anabaena* sp. encoding an inhibitor of the NucA sugar non-specific nuclease. *J. Mol. Biol.* **268**, 589-598.

Muscarella, D.E. & Vogt, V.M. (1989). A mobile group I intron in the nuclear rDNA of *Physarum polycephalum*. *Cell* **56**, 443-454.

Nestle, M. & Roberts, W.K. (1969a). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens* – I. Purification and some properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **244**, 5213-5218.

Nestle, M. & Roberts, W.K. (1969b). An extracellular nuclease from *Serratia marcescens* – II. Specificity of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **244**, 5219-5225.

Nogues, M.V., Vilanova, M. & Cuchillo, C.M. (1995). Bovine pancreatic ribonuclease A as a model of an enzyme with multiple substrate binding sites. *Biochim. Biophys. Acta* **1253**, 116-24.

Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H. & Nagai, K. (1994). Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* **372**, 432-438.

Pace, C.N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. & Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2425.

Pan, C.Q. & Lazarus, R.A. (1997). Engineering hyperactive variants of human deoxyribonuclease I by altering its functional mechanism. *Biochemistry* **36**, 6624-6632.

Pan, C.Q. & Lazarus, R.A. (1998). Hyperactivity of human DNase I variants. *J. Biol. Chem.* **273**, 11701-11708.

Pares, X., Nogues, M.V., de Llorens, R. & Cuchillo, C.M. (1991). Structure and function of ribonuclease A binding subsites. *Essays Biochem.* **26**, 89-103.

Pedersen, J., Pedersen, M., Soeberg, H. & Biedermann, K. (1993). Separation of isoforms of *Serratia marcescens* nuclease by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr.* **645**, 353-361.

Pedersen, J., Andersen, J., Roepstorff, P., Filimonova, M. & Biedermann, K. (1995). Characterization of *Serratia marcescens* nuclease isoforms by Electrospray Mass Spectrometry. *Biochemistry (Moskau)* **60**, 341-346.

Pei, D. & Schultz, P.G. (1993). Artificial nucleases. In: Linn, S.M., Lloyd, R.S. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (2<sup>nd</sup>). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 317-340.

Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. & Tschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). *EMBO J.* **12**, 371-377.

Pingoud, A., Alves, J. & Geiger, R. (1993). Restriction enzymes. *Methods Mol. Biol.* **16**: Enzymes of molecular biology. Ed. M.M. Burrell. Humana Press, Totowa, NJ. 107 – 200.

Pingoud, A. & Jeltsch, A. (1997). Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases. *Eur. J. Biochem.* **246**, 1-22.

Pingoud, A. & Urbanke, C. (1997). *Arbeitsmethoden der Biochemie*. deGruyter, Berlin, New York.

Prats, E., Noel, M., Letourneau, J., Tiranti, V., Vaque, J., Debon, R., Zeviani, M., Cornudella, L. & Ruiz-Carillo, A. (1997). Characterization and expression of the mouse endonuclease G gene. *DNA Cell. Biol.* **16**, 1111-1122.

Puyet, A., Greenberg, B. & Lacks, S.A. (1990). Genetic and structural characterization of EndA: A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* **213**, 727-738.

Raaijmakers, H., Toro, I., Birkenbihl, R., Kemper, B. & Suck, D. (2001). Conformational flexibility in T4 endonuclease VII revealed by crystallography: implications for substrate binding and cleavage. *J. Mol. Biol.* **308**, 311-323.

Raines, R.T. (1998). Ribonuclease A. *Chem. Rev.* **98**, 1045-1066.

Ramsey, B.W. (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **335**, 179-188.

Roberts, R.J. & Halford, S.E. (1993). Type II restriction endonucleases. In: Linn, S.M., Lloyd, R.S. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (2<sup>nd</sup>). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 35-88.

Ruiz-Carrillo, A. & Côté, J. (1993). Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**, 765-769.

Sadowski, P.D. (1982). Role of nucleases in genetic recombination. In: Linn, S.M. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (1<sup>st</sup>), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 23-40.

Sanger, F. & Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**, 441-448.

Schumaker, V.N., Richards, E.G. & Schachmann, H.K. (1960). *JACS* **78**, 4320.

Shlyapnikov, S.V., Lunin, V.V., Perbandt, M., Polyakov, K.M., Lunin, V.Yu., Levnikov, V.M., Betzel, Ch. & Mikhailov, A.M. (2000). Atomic structure of the *Serratia marcescens* endonuclease at 1.1 Å resolution and the enzyme reaction mechanism. *Acta Cryst. D* **56**, 567-572.

Srivastava, T.K., Friedhoff, P., Pingoud, A. & Katti, S.B. (1999). Application of oligonucleoside methylphosphonates in the studies on phosphodiester hydrolysis by *Serratia* endonuclease. *Nucleosides Nucleotides* **18**, 1945-1960.

Steyaert, J. & Engelborghs, Y. (1995). A two-binding-site kinetic model for the ribonuclease-T1-catalysed transesterification of dinucleoside phosphate substrates. *Eur. J. Biochem.* **233**, 140-144.

Steyaert, J. (1997). A decade of protein engineering on ribonuclease T<sub>1</sub>. Atomic dissection of the enzyme-substrate interactions. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1-11.

Suck, D. & Oefner, C. (1986). Structure of DNaseI at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature* **321**, 621-625.

Suh, Y., Alpaugh, M., Krause, K.L. & Benedik, M.J. (1995). Differential secretion of isoforms of *Serratia marcescens* extracellular nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4083-4088.

Tainer, J.A., Thayer, M.M. & Cunningham, R.P. (1995). DNA repair proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 20-26.

Thompson, J.E. & Raines, R.T. (1994). Value of general acid-base catalysis to Ribonuclease A. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 5467-5468.

Tiranti, V., Rossi, E., Ruiz-Carillo, A., Rossi, G., Rocchi, M., DiDonato, S., Zuffardi, O. & Zeviani, M. (1995). Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP), and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* **25**, 559-564.

Vescia, S. & Tramontano, D. (1981). Antitumoral action of bovine seminal ribonuclease. *Mol. Cell. Biochem.* **36**, 125-128.

Vincent, R.D., Hofmann, T.J. & Zassenhaus, H.P. (1988). Sequence and expression of NUC1, the gene encoding the mitochondrial nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **16**, 3297-3312.

Wahle, E. (1995). 3' -end cleavage and polyadenylation of mRNA precursors. *Biochim. Biophys. Acta* **1261**, 183-194.

Wang, J.C. (1982). DNA topoisomerases. In: Linn, S.M. & Roberts, R.J. (ed.). *Nucleases* (1<sup>st</sup>), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 41-58.

Wende, W. (1995). Neue Strategien zur Expression und Aufreinigung von Nukleasen. Inauguraldissertation, Universität Hannover.

Wenz, C., Jeltsch, A. & Pingoud, A. (1996). Probing the indirect readout of the restriction enzyme *EcoRV*. Mutational analysis of contacts to the DNA backbone. *J. Biol. Chem.* **271**, 5565-5573.

Wittmayer, P.K. & Raines, R.T. (1996). Substrate binding and turnover by the highly specific I-PpoI endonuclease. *Biochemistry* **35**, 1076-1083.

Yang, W. & Steitz, T.A. (1995). Crystal structure of the site-specific recombinase gamma delta resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell* **82**, 193-207.

Yonemura, K., Matsumoto, K. & Maeda, H. (1983). Isolation and characterization of nucleases from a clinical isolate of *Serratia marcescens* kums 3958. *J. Biochem.* **93**, 1287-1295.



Zabeau, M. & Stanley, K.K. (1982). Enhanced expression of cro-beta-galactosidase fusion proteins under the control of the P<sub>R</sub> promotor of bacteriophage lambda. *EMBO J.* **1**, 1217-1222.

Zhivotovsky, B., Wade, D., Nicotera, P., & Orrenius, S. (1994). Role of nucleases in apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **105**, 333-338.

## 7.1 Protein- und Gensequenz der *Serratia* Nuklease

									1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Met	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Ser	Ile	Asp	Asn	Cys	Ala
ATG	CAT	CAT	CAT	CAC	CAT	CAC	GGA	TCC	GAC	ACG	CTC	GAA	TCC	ATC	GAC	AAC	TGC	GCG
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
Val	Gly	Cys	Pro	Thr	Gly	Gly	Ser	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Val	Arg	His	Ala	Tyr	Thr
GTC	GGC	TGC	CCG	ACC	GGC	GGC	AGC	AGC	AAC	GTG	TCT	ATC	GTG	CGT	CAT	GCT	TAT	ACG
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
Leu	Asn	Asn	Asn	Ser	Thr	Thr	Lys	Phe	Ala	Asn	Trp	Val	Ala	Tyr	His	Ile	Thr	Lys
TTG	AAC	AAC	AAC	AGC	ACC	ACC	AAG	TTC	GCC	AAC	TGG	GTG	GCT	TAT	CAC	ATC	ACC	AAA
49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
Asp	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Lys	Thr	Arg	Asn	Trp	Lys	Thr	Asp	Pro	Ala	Leu	Asn	Pro
GAC	ACA	CCG	GCC	AGC	GGC	AAG	ACG	CGC	AAC	TGG	AAA	ACC	GAT	CCG	GCG	CTC	AAC	CCG
68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
Ala	Asp	Thr	Leu	Ala	Pro	Ala	Asp	Tyr	Thr	Gly	Ala	Asn	Ala	Ala	Leu	Lys	Val	Asp
GCG	GAC	ACG	TTG	GCG	CCC	GCC	GAT	TAC	ACT	GGC	GCC	AAC	GCG	GCG	CTG	AAG	GTC	GAT
87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105
Arg	Gly	His	Gln	Ala	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Gly	Val	Ser	Asp	Trp	Glu	Ser	Leu
CGC	GGT	CAT	CAG	GCG	CCG	CTG	GCC	TCG	CTG	GCG	GGC	GTC	TCC	GAC	TGG	GAA	TCG	CTG
106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
Asn	Tyr	Leu	Ser	Asn	Ile	Thr	Pro	Gln	Lys	Ser	Asp	Leu	Asn	Gln	Gly	Ala	Trp	Ala
AAT	TAC	CTG	TCC	AAC	ATC	ACG	CCG	CAA	AAG	TCC	GAT	CTT	AAC	CAG	GGC	GCC	TGG	GCG
125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
Arg	Leu	Glu	Asp	Gln	Glu	Arg	Lys	Leu	Ile	Asp	Arg	Ala	Asp	Ile	Ser	Ser	Val	Tyr
CGG	CTG	GAA	GAT	CAG	GAA	CGC	AAG	CTG	ATC	GAT	CGC	GCC	GAT	ATC	TCC	TCG	GTC	TAT
144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
Thr	Val	Thr	Gly	Pro	Leu	Tyr	Glu	Arg	Asp	Met	Gly	Lys	Leu	Pro	Gly	Thr	Gln	Lys
ACC	GTG	ACC	GGG	CCG	CTG	TAT	GAA	CGC	GAT	ATG	GGC	AAA	CTG	CCG	GGC	ACC	CAG	AAA
163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181
Ala	His	Thr	Ile	Pro	Ser	Ala	Tyr	Trp	Lys	Val	Ile	Phe	Ile	Asn	Asn	Ser	Pro	Ala
GCG	CAC	ACC	ATC	CCC	AGC	GCC	TAC	TGG	AAG	GTG	ATT	TTC	ATC	AAC	AAC	AGC	CCG	GCG
182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Val	Asn	His	Tyr	Ala	Ala	Phe	Leu	Phe	Asp	Gln	Asn	Thr	Pro	Lys	Gly	Ala	Asp	Phe
GTG	AAC	CAC	TAT	GCT	GCT	TTC	CTG	TTC	GAT	CAG	AAC	ACG	CCG	AAG	GGC	GCC	GAT	TTC
201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219
Cys	Gln	Phe	Arg	Val	Thr	Val	Asp	Glu	Ile	Glu	Lys	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile	Ile	Trp
TGC	CAA	TTC	CGC	GTG	ACG	GTG	GAC	GAG	ATC	GAG	AAA	CGC	ACC	GGC	CTG	ATC	ATC	TGG
220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238
Ala	Gly	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Gln	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Pro	Gly	Val	Leu	Pro
GCC	GGT	CTG	CCG	GAC	GAC	GTG	CAG	GCT	TCG	CTG	AAG	AGC	AAA	CCG	GGC	GTT	CTG	CCG
239	240	241	242	243	244	245												
Lys	Leu	Met	Gly	Cys	Lys	Asn	***											
AAG	TTG	ATG	GGC	TGC	AAA	AAC	TGA											

## 7.2 Sequenzen der verwendeten PCR-Primer

Die Sequenzen der Desoxyribonukleotide sind in 5'→3'-Richtung angegeben. Bei den Mutagenese-Primern sind Nukleotidaustausche durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet. Markerschnittstellen wurden unterstrichen, das jeweilige Markerenzym ist aufgeführt.

### 7.2.1 PCR-Primer

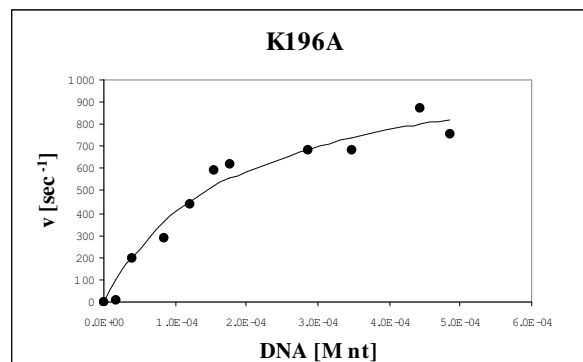
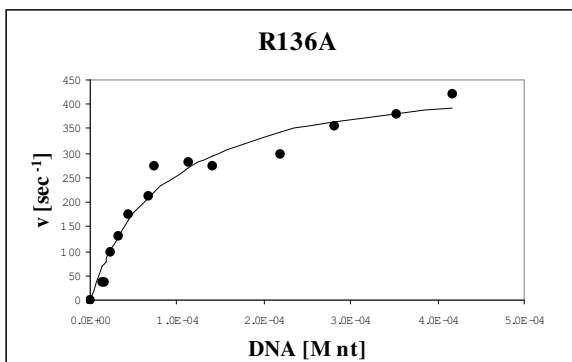
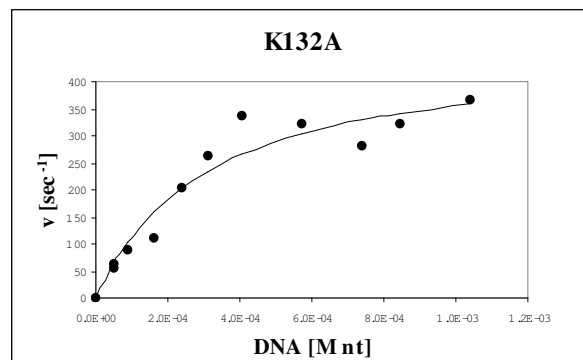
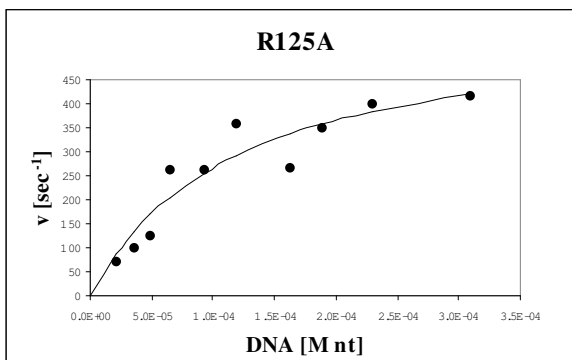
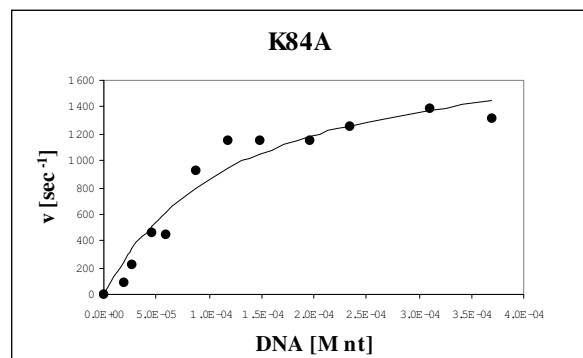
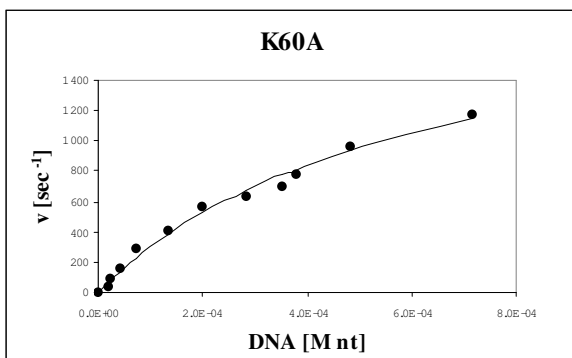
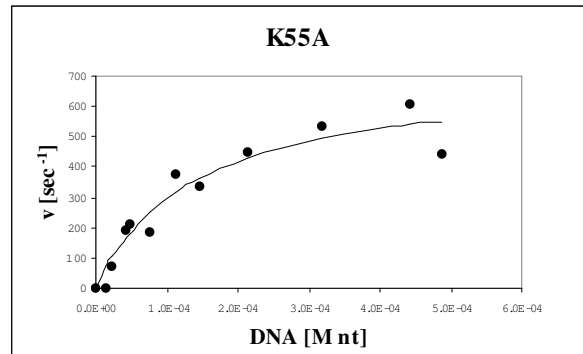
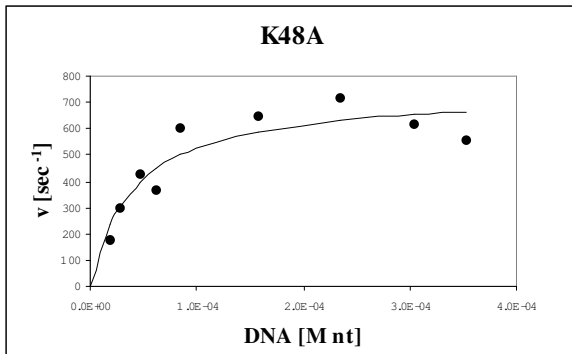
(*forward* und *reverse* gibt die Orientierung auf dem Plasmid pHisNuc an):

1602( <i>forward</i> )	5'-GGCATGCATGGATCCGACACGCTCGAATCCATC-3'
LLE ( <i>reverse</i> )	5'-GGACGGTGCCGCAACAGGGGTCGACGTCAGTTTTTGCAG-3'
LSE ( <i>reverse</i> )	5'-GGACGGTGCCGCAACAGGG-3' (bindet am 5'-Überhang von LLE)
LS ( <i>reverse</i> )	5'-CGCTCGAGGTCAGTTTTTGCAGCCCATGAG-3'
67 ( <i>forward</i> )	5'-TGGGGTGTGTGATACGAAACGAAGC-3'
66 ( <i>reverse</i> )	5'-CAGGATGGTGTGCGCTTTCTGGGT-3'
65 ( <i>forward</i> )	5'-CAGGACTGGGAATCGCTGAATTACCT-3'

### 7.2.2 Mutagenese-Primer

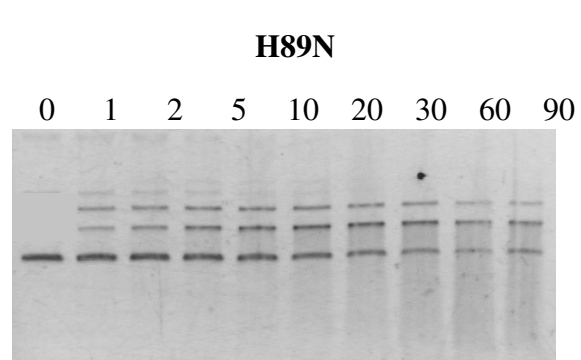
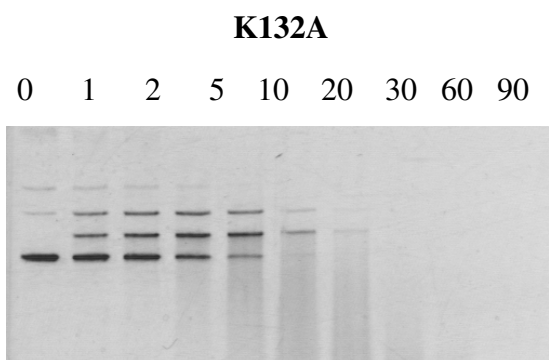
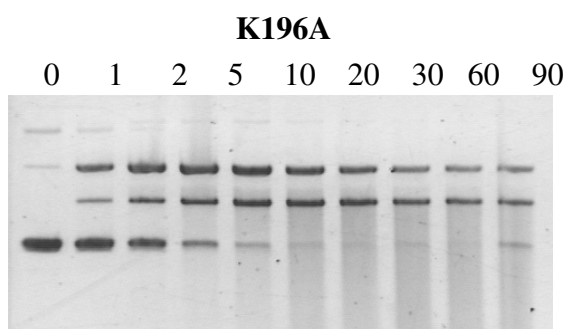
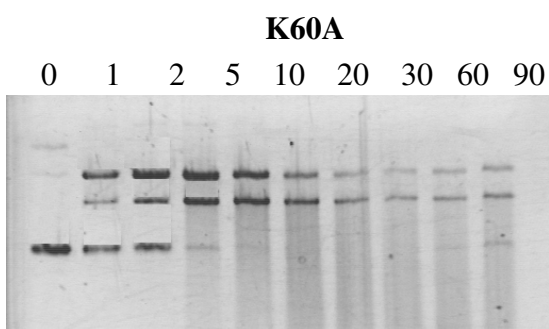
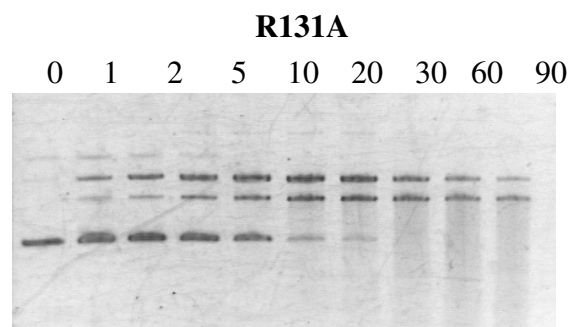
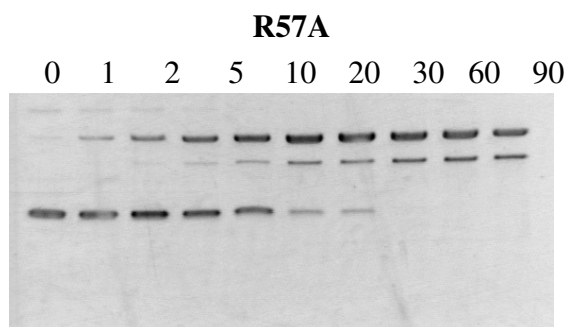
K48A	5'-ATCACATCAC <u>tgc</u> AGACACACCGGCCAG-3'	<i>Pst</i> I
K55A	5'-GGCCAGCGGCgcG <u>ACGCG</u> tAACTGGAAAA-3'	<i>Mlu</i> I
K60A	5'-GCAACTGGgcAACgG <u>Acc</u> CGGCGCT-3'	<i>Ava</i> II
K84A	5'-CAACGCGGCG <u>CT</u> agcaGTCGATCGC-3'	<i>Nhe</i> I
R125A	5'-GCGCCTGGGCGgcctT <u>GGA</u> AAGATCAG-3'	<i>Sty</i> I
K132A	5'-ATCAGGAACGagcG <u>CT</u> GATCGATC-3'	<i>Eco</i> 47III
R136A	5'-CTGATCGATgcaG <u>Ct</u> GATATCTCCT-3'	<i>Pvu</i> II
K196A	5'-CAGAACACGCCGgcccG <u>GCG</u> CCGATTCT-3'	<i>Nae</i> I

### 7.3 Michaelis-Menten-Diagramme der Bindungsmutanten

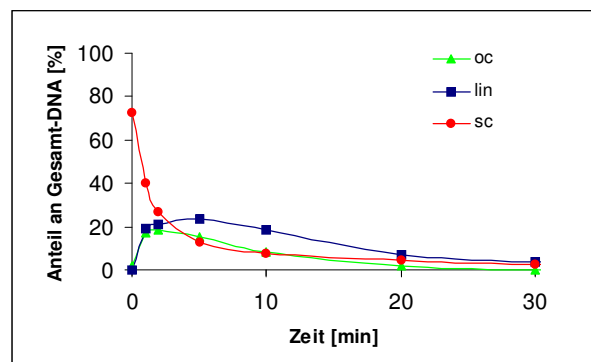
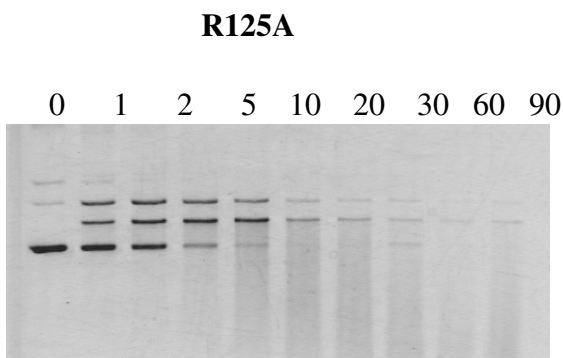
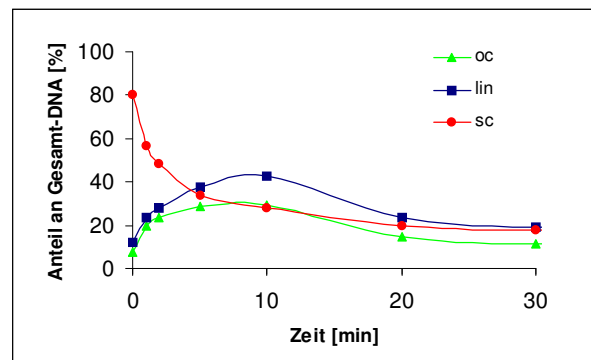
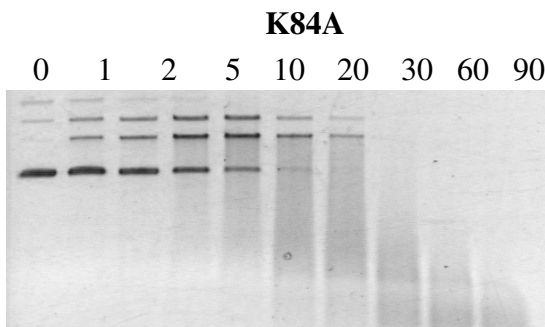
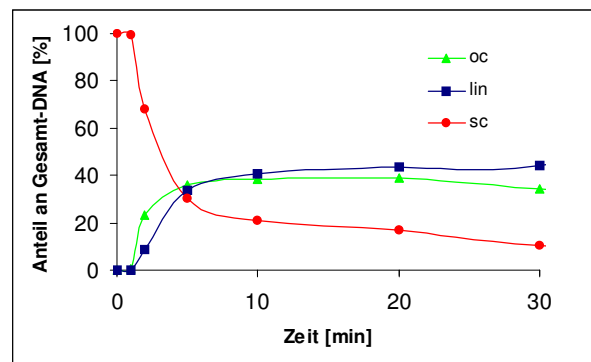
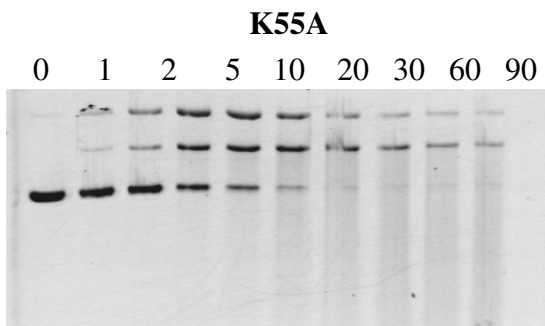
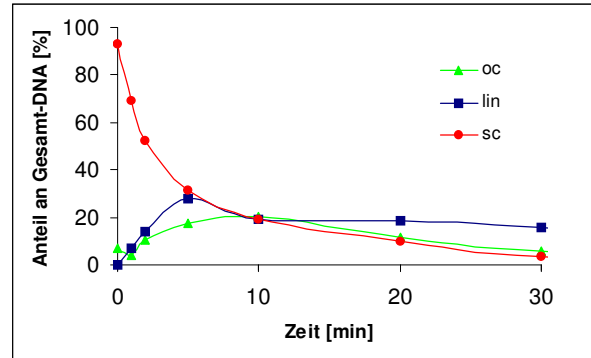
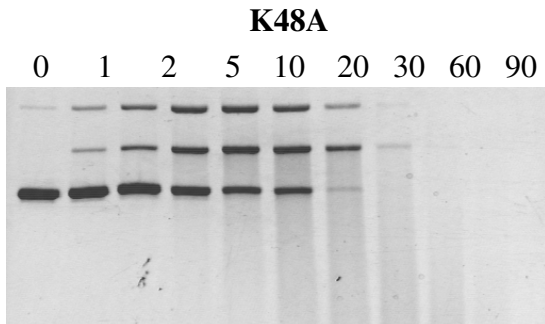


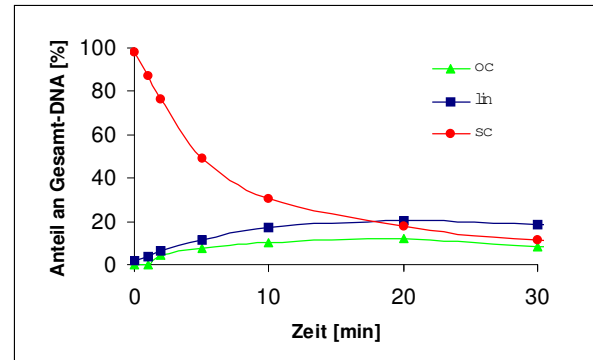
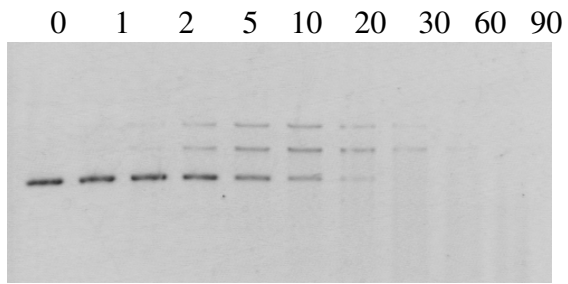
## 7.4 Plasmidspaltungen

### 7.4.1 Agarosegele



## 7.4.2 Agarosegele und quantitative Auswertungen ausgewählter Mutanten



**R136A**

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten:

Name: Bettina Haberland, geb. Kolmes  
Geburtsdatum: 16.02.1969  
Geburtsort: Lingen (Ems)  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

## Werdegang:

1975 – 1979      Grundschule Lingen / Laxten  
1979 – 1981      Orientierungsstufe Marienschule Lingen  
1981 – 1988      Franziskusgymnasium Lingen, Abschluß Abitur  
  
10/1988 – 08/1994    Studium der Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen  
09/1994 – 06/1995    Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen zum Thema „Kinetische und thermodynamische Untersuchungen zur Bindung und Spaltung verschiedener Oligonukleotid-substrate durch die extrazelluläre Endonuklease aus *Serratia marcescens*“  
10/1995 – 09/1999    wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen  
01/1997 – 02/1998    Erziehungsurlaub  
seit 10/1995          Promotion am Institut für Biochemie, Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter Anleitung von Prof. Dr. A. Pingoud



Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form noch keinem anderen Prüfungsausschuß vorgelegt.

Bettina Haberland

Gießen, im Oktober 2001